

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年2月8日 (08.02.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/09321 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/12, C07K
14/47, 16/18, C12P 21/08
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/05068
- (22) 国際出願日: 2000年7月28日 (28.07.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平11/248036 1999年7月29日 (29.07.1999) JP
特願平11/300253 1999年8月27日 (27.08.1999) JP
60/159,590 1999年10月18日 (18.10.1999) US
特願2000/118776 2000年1月11日 (11.01.2000) JP
60/183,322 2000年2月17日 (17.02.2000) US
特願2000/183767 2000年5月2日 (02.05.2000) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社
ヘリックス研究所 (HELIX RESEARCH INSTITUTE)
[JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532番地3
Chiba (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 太田紀夫 (OTA,

Toshio) [JP/JP]; 〒251-0042 神奈川県藤沢市辻堂新町
1-2-7-105 Kanagawa (JP). 磯貝隆夫 (ISOGAI, Takao)
[JP/JP]; 〒300-0303 茨城県稲敷郡阿見町大室511-12
Ibaraki (JP). 西川哲夫 (NISHIKAWA, Tetsuo) [JP/JP];
〒173-0013 東京都板橋区永川町27-3-403 Tokyo (JP).
林 浩司 (HAYASHI, Koji) [JP/JP]; 〒299-0125 千
葉県市原市有秋台西1-9-446 Chiba (JP). 齋藤 薫
(SAITO, Kaoru) [JP/JP]; 〒292-0056 千葉県木更津市
木更津2-8-1-201 Chiba (JP). 山本順一 (YAMAMOTO,
Jun-ichi) [JP/JP]; 〒292-0041 千葉県木更津市清見台
東3-28-3-A101 Chiba (JP). 石井静子 (ISHII, Shizuko)
[JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那4508-19-202
Chiba (JP). 杉山友康 (SUGIYAMA, Tomoyasu) [JP/JP];
〒292-0045 千葉県木更津市清見台2-6-23-102 Chiba
(JP). 若松 愛 (WAKAMATSU, Ai) [JP/JP]; 〒292-0014
千葉県木更津市高柳1473-4-202 Chiba (JP). 永井啓一
(NAGAI, Keiichi) [JP/JP]; 〒207-0022 東京都東大和市
桜が丘3-44-14-9-204 Tokyo (JP). 大槻哲嗣 (OTSUKI,
Tetsuji) [JP/JP]; 〒292-0055 千葉県木更津市朝日
3-1-10-B102 Chiba (JP). 村上弘次 (MURAKAMI,
Kohji) [JP/JP]. 矢野和宏 (YANO, Kazuhiro) [JP/JP]. 神
崎康治 (KANZAKI, Kouji) [JP/JP]. 井上佳久 (INOUE,
Yoshihisa) [JP/JP]; 〒573-1153 大阪府枚方市招提大谷
2-25-1 ウェルファイド株式会社 創薬研究所内 Osaka
(JP).

/続葉有/

(54) Title: GENE ENCODING NOVEL TSP1-LIKE PROTEIN

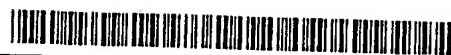
(54) 発明の名称: 新規なTSP1様蛋白質をコードする遺伝子

(57) Abstract: By using an oligocap method originally developed to isolate full-length cDNA, full-length cDNAs are isolated from a human 10 week-aged fetal tissue cDNA library. Among these cDNAs, a clone (hC-HEM BB1000317) encoding a novel TSP1-like protein is isolated. Further, a mouse cDNA (mC-HEM BB1000317) corresponding to this human cDNA is successfully isolated. C-HEM BB1000317 shows lowered expression in a brain tumor tissue, which suggests it might relate to brain tumor.

(57) 要約:

完全長 cDNA を単離するために独自に開発したオリゴキャップ法により、ヒト 10 週齢胎児組織 cDNA ライブラリーから完全長 cDNA を複数単離し、その中から新規な新規な TSP1 様の蛋白質をコードするクローン (hC-HEM BB1000317) を単離した。さらに、該ヒト cDNA に対応するマウス cDNA (mC-HEM BB1000317) を単離することにも成功した。C-HEM BB1000317 は、脳腫瘍組織においてはその発現が低下していたことから脳腫瘍との関連が示唆された。

WO 01/09321 A1



(74) 代理人: 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

新規な T S P 1 様蛋白質をコードする遺伝子

技術分野

本発明は、新規な TSP1 様蛋白質、その遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関する。

背景技術

トロンボスポンジン (thrombospondin; TSP) は、血小板の凝集によって放出されるヘパリン結合性の糖タンパク質で、分子量 140~150kDa の同一鎖の三量体である。TSP は血小板の他に、血管内皮細胞、繊維芽細胞、単球/マクロファージなど種々の細胞でも合成されている。TSP には TSP1、TSP2/CIPS、TSP3、TSP4、TSP5/COMP の 5 つのファミリーが見出されている。そのうち TSP1 の type 1 repeats を含む 385-522 アミノ酸領域が TSP1 ドメイン領域 (TSP/type1) であることが確認されている (Tolsma SS ら : J. Cell Biol. 122 : 497-511, 1993)。TSP1 ドメインの WSXW モチーフは細胞表面のヘパリン硫酸プロテオグリカンに結合することが知られており、さらに CSVTCG モチーフは CD36/LIMP11 受容体などに結合することが知られている。また、最近、上記 TSP1 ドメインを用いた新規 cDNA の検索から、TSP1 ドメイン、メタロプロテアーゼおよびデスインテグリンドメインを有し、血管新生抑制作用を有する METH-1 および METH-2 を見出したことが報告されている (Vazquez F ら : J. Biol. Chem. 274 : 23349-23357, 1999)。

TSP の主な生理的作用は血管新生の抑制である。その作用機序としてはヘパリン、フィブロネクチン、コラーゲンなどへの結合性を有することから塩基性繊維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor ; bFGF) などの作用を修飾する、あるいは細胞の接着性を変化させるなどの可能性が考えられる。

血管新生 (angiogenesis) は既存の血管から新しく毛細血管がつくられることを指し、胎児での血管叢の形成 (vasculogenesis) とは区別されている。生理的な血管新生は卵巣や子宮粘膜で性周期に応じて起こっており、胎盤の形成時にもみられる。また創傷治癒過程での肉芽組織、心筋梗塞など血管が閉塞し、その後に側副血行路がつくられるときにもみられる。これら生理的な血管新生は一時的であり、血管新生の目的 (組織への酸素、栄養の補給) が果たされると毛細血管の成長が停止する。それに対し、疾患に伴って毛細血管の成長が停止しない場合もある。

現在、血管新生が原因となる疾患 (いわゆる血管新生病) として眼科的疾患 (増殖性糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、虹彩ルベオーシス、鎌状赤血球網膜症、網膜中心静脈閉塞症、網膜静脈分枝閉塞症、網膜中心動脈閉塞症、老人性円板状黄斑変性症、その他虚血をきたす眼科疾患)、慢性関節リウマチ、血管腫、血管繊維腫、尋常性乾癬、粥状動脈硬化巣外膜の異常毛細血管網などが挙げられる。また、逆に血管新生が不十分である血管新生不全症としては虚血性心疾患、下肢の閉塞性動脈硬化症での側副血行路形成不全や、創傷治癒過程での血管新生が不十分なことによる難治性皮膚腫瘍、難治性胃潰瘍、手術後の癒合不全などがある (Folkman J. ら : Science 235 : 442-447, 1987、井藤英喜 : 最新医学 50(6) : 1121-1125, 1995)。また、固形腫瘍にみられる血管新生は腫瘍を急速に増殖させ、転移を引き起こし、腫瘍が宿主に引き起こす症状が悪化する原因となる。近年種々の研究から腫瘍細胞が血管新生を誘起する物質を産生しているとの知見が得られている。一方、癌抑制遺伝子産物の p53 は種々の遺伝子の発現を誘導するが、その遺伝子産物の一つが TSP であることが見出されている (Dameron KM, ら : Science 265 : 1582-1584, 1994)。

したがって TSP1 ドメインの存在を指標として新規 cDNA ひいてはタンパク質を検索することは、TSP1 ドメイン含有新規 cDNA ひいてはタンパク質の入手を容易にし、TSP の関与する疾患 (血管新生不全症、血管新生病、癌の増殖および転移

など)の解明、予防、治療および診断を可能とする上で非常に有用なものとなると考えられる。

発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、新規な TSP1 様蛋白質、その遺伝子、並びにそれらの製造方法および用途を提供することにある。

本発明者らは、上記の課題を解決するために、まず、完全長 cDNA を単離するために独自に開発したオリゴキャップ法により、ヒト 10 週齢胎児組織 cDNA ライブラリーから完全長 cDNA を複数単離した。単離した cDNA の一つにつき塩基配列を決定し、その構造解析を行なったところ、TSP1 ドメインの 2 回繰り返し構造および EGF 様ドメインの 7 回繰り返し構造と思われる領域を有していた。このため、該 cDNA は新規な TSP1 様の蛋白質をコードしていることが判明した（このクローンを「hC-HEMBB1000317」と命名した）。また、本発明者等は、該ヒト cDNA に対応するマウス cDNA を単離することにも成功した（このクローンを「mC-HEMBB1000317」と命名した。ヒトおよびマウスのクローンを総称して「C-HEMBB1000317」と称する）。C-HEMBB1000317 は、脳腫瘍組織においてはその発現が低下していたことから脳腫瘍との関連が示唆された。また紫外線照射によって発現が低下することから皮膚癌への関連も考えられる。

本発明は、新規な TSP1 様蛋白質 C-HEMBB1000317 および該蛋白質をコードする DNA、並びにそれらの製造および用途に関し、より詳しくは、

(1) 下記 (a) から (d) のいずれかに記載の DNA、

(a) 配列番号：5 から 8 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA。

(b) 配列番号：1 から 4 のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含む DNA

(c) 配列番号：5から8のいずれかに記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：5から8のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA。

(d) 配列番号：1から4のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、配列番号：5から8のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA。

(2) 配列番号：5から8のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードする DNA、

(3) (1)または(2)に記載の DNA によりコードされる蛋白質またはペプチド、

(4) (1)または(2)に記載の DNA が挿入されたベクター、

(5) (1)または(2)に記載の DNA または(4)に記載のベクターを保持する形質転換体、

(6) (5)に記載の形質転換体を用いて蛋白質またはペプチドを発現させる工程および発現させた蛋白質またはペプチドを回収する工程を含む、(3)に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法、

(7) (3)に記載の蛋白質またはペプチドに結合する抗体、

(8) 配列番号：1から4のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖に相補的な少なくとも 15 ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、

(9) (3)に記載の蛋白質またはペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 該蛋白質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該蛋白質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程

(c) 該蛋白質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択す

る工程、を含む方法、および

(10) (1) 若しくは (2) に記載の DNA、(3) に記載の蛋白質若しくはペプチド、または (4) に記載のベクターを含有する医薬組成物、を提供するものである。

本発明は、新規な蛋白質「C-HEMBB1000317」を提供する。本発明の蛋白質に含まれるヒト由来の C-HEMBB1000317 蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：5 に、該蛋白質をコードする cDNA の塩基配列を配列番号：1 に示す。また、マウス由来の C-HEMBB1000317 蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：6 から 8 に、該蛋白質をコードする cDNA の塩基配列を配列番号：2 から 4 に示す。ヒト由来の C-HEMBB1000317 遺伝子は、TSP1 の特徴を有する蛋白質をコードする。ヒト由来の C-HEMBB1000317 遺伝子は、脳腫瘍組織で正常組織と比較して発現の低下が認められたため脳腫瘍と関連していることが示唆される。このため本発明の遺伝子の発現量を測定することによる脳腫瘍の診断や脳腫瘍の予防剤または治療剤のスクリーニング等を行うことが考えられる。また、本発明のマウス由来の遺伝子を用いることにより、ノックアウトマウスの調製や脳腫瘍モデル動物の調製、さらに、同モデル動物を用いた脳腫瘍の予防剤や治療剤のスクリーニング等を行うことも考えられる。

C-HEMBB1000317 蛋白質は、組換え蛋白質として、また天然の蛋白質として調製することが可能である。組換え蛋白質は、例えば、後述するように本発明の蛋白質をコードする DNA を挿入したベクターを適当な宿主細胞に導入し、形質転換体内で発現した蛋白質を精製することにより調製することが可能である。一方、天然の蛋白質は、例えば、後述する本発明の蛋白質に対する抗体を結合したアフィニティーカラムを利用して調製することができる (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 16.1-16.19)。アフィニティー精製に用いる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。また、インビトロトランスレーション (例えば、「On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treat

d rabbit reticulocyte lysate system. Dasso, M.C., Jackson, R.J. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:3129-3144」参照) などにより本発明の蛋白質を調製することも可能である。

本発明には、本実施例において同定されたヒト由来の C-HEMBB1000317 蛋白質と機能的に同等な蛋白質が含まれる。このような蛋白質には、例えば、配列番号：5 から 8 に記載の C-HEMBB1000317 蛋白質の変異体、ホモログ、バリエーションなどが含まれる。ここで「機能的に同等」とは、対象となる蛋白質が C-HEMBB1000317 蛋白質と同様の生物学的機能あるいは生化学的機能を有することを指す。このような機能としては、プロテオグリカンに代表される細胞表層分子や細胞外マトリックス分子への結合能等の生化学的機能や、血管新生の制御、例えば血管内皮細胞の増殖調節、あるいは腫瘍組織での発現量低下による腫瘍の増殖や転移の促進等の生物学的機能が挙げられる。

これら本実施例において同定された蛋白質と機能的に同等な蛋白質は、当業者であれば、例えば、蛋白質中のアミノ酸配列に変異を導入する方法（例えば、部位特異的変異誘発法 (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 8.1-8.5)) を利用して調製することができる。また、このような蛋白質は、自然界におけるアミノ酸の変異により生じることもある。本発明には、このように本実施例において同定された蛋白質と同等の機能を有する限り、そのアミノ酸配列（配列番号：5 から 8）において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／もしくは付加などにより異なる蛋白質が含まれる。

蛋白質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、その機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、30 アミノ酸以内であり、好ましくは 10 アミノ酸以内であり、さらに好ましくは 5 アミノ酸以内（例えば、3 アミノ酸以内）である。置換されるアミノ酸は、蛋白質の機能の保持の観点から、置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましい。例えば、Ala、Val、Le

u、Ile、Pro、Met、Phe、Trp は、共に非極性アミノ酸に分類されるため、互いに似た性質を有すると考えられる。また、非荷電性としては、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Gln が挙げられる。また、酸性アミノ酸としては、Asp および Glu が、塩基性アミノ酸としては、Lys、Arg、His が挙げられる。

本実施例において同定された蛋白質と機能的に同等な蛋白質は、当業者に周知のハイブリダイゼーション技術(Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.3-6.4)、あるいは 遺伝子増幅技術(PCR) (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4) を利用して単離することも可能である。即ち、当業者であれば、本実施例において同定された蛋白質をコードする DNA (配列番号: 1 から 4) またはその一部をプローブとして、あるいは該 DNA と特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、該 DNA とハイブリダイズする DNA を単離することができる。さらに単離した DNA を基に、該 DNA によりコードされる蛋白質を調製することができる。本発明には、本実施例において同定された蛋白質と同等の機能を有する限り、これら蛋白質をコードする DNA とハイブリダイズする DNA によりコードされる蛋白質が含まれる。機能的に同等な蛋白質を単離するための生物としては、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウシ等の脊椎動物が挙げられるが、これらに制限されない。

機能的に同等な蛋白質をコードする DNA を単離するためのハイブリダイゼーションのストリンジェントな条件は、通常「1xSSC、0.1% SDS、37°C」程度であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42°C」程度であり、さらに厳しい条件としては「0.1xSSC、0.1% SDS、65°C」程度であり、ハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有する DNA の単離を期待しうる。但し、上記 SSC、SDS および温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する上記若しく

は他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

このようなハイブリダイゼーション技術あるいは遺伝子増幅技術を利用して単離される蛋白質は、配列番号：5から8に記載の本発明の蛋白質と比較して、通常、そのアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも50%以上、さらに好ましくは70%以上、さらに好ましくは90%以上（例えば、95%以上）の配列の同一性を指す。アミノ酸配列の相同性は、BLAST X による相同性検索により決定することができる。

本発明は、また、本発明の蛋白質の部分ペプチドを提供する。本発明の蛋白質の部分ペプチドは、例えば、本発明の蛋白質に結合する抗体の調製に利用することができる。本発明の部分ペプチドは、少なくとも7アミノ酸、好ましくは9アミノ酸以上、より好ましくは12アミノ酸以上、より好ましくは15アミノ酸以上のアミノ酸配列からなる。本発明の部分ペプチドは、例えば、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

本発明は、また、本発明の蛋白質をコードするDNAを提供する。本発明のDNAとしては、本発明の蛋白質をコードしうるものであれば、その形態に特に制限はなく、cDNA の他、ゲノムDNA、化学合成DNAなども含まれる。また、本発明の蛋白質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するDNAが含まれる。本発明の蛋白質をコードするDNAは、上記のように、配列番号：1から4に記載のDNA配列もしくはその一部をプローブとしたハイブリダイゼーション法やこれらDNA配列の情報に基づき設計したプライマーを用いた遺伝子増幅法（PCR）等の常法により単離することが可能である。

本発明は、また、本発明の蛋白質をコードするDNAが挿入されたベクターを提供する。本発明のベクターとしては、挿入したDNAを安定に保持するものであれ

ば特に制限されず、例えば 宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしては pBluescript ベクター(Stratagene 社製)などが好ましい。本発明の蛋白質を生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、試験管内発現であれば pBEST ベクター (プロメガ社製) を、大腸菌における発現であれば pET ベクター (Novagen 社製) を、培養細胞における発現であれば pME18S-FL3 ベクター (GenBank Accession No. AB009864) を、生物個体における発現であれば pME18S ベクター (Mol Cell Biol. 8:466~472(1988)) を、好適に用いることができる。本発明の蛋白質をコードする DNA のベクターへの挿入は常法、例えば、制限酵素サイトを用いたりリガーゼ反応 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4~11.11) により行うことができる。

本発明は、また、本発明の蛋白質をコードする DNA または該 DNA が挿入されたベクターを保持する形質転換体を提供する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。宿主細胞は、例えば、本発明のタンパク質の製造のために使用することができる。タンパク質製造のための産生系は、in vitro および in vivo の産生系がある。in vitro の産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。また、本発明の宿主細胞には、C-HEM BB1000317 蛋白質の機能解析や C-HEM BB1000317 蛋白質を利用したその機能阻害剤や機能促進剤のスクリーニングのために用いる目的の細胞も含まれる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9) 、リポフェクタミン法 (GIBCO-BRL 社製) 、マイクロインジェクション法などの方法で行うことが可能である。形質転換体が

らの C-HEMBB1000317 蛋白質の調製は、当業者に公知の蛋白質の分離・精製法を利用して行なうことができる。

本発明はまた、配列番号：1 から 4 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖に相補的な少なくとも 15 ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを提供する。ここで「相補鎖」とは、A:T、G:C の塩基対からなる 2 本鎖 DNA の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも 70 %、好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは 90%、さらに好ましくは 95% 以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。

このようなポリヌクレオチドは、本発明の蛋白質をコードする DNA を検出、単離するためのプローブとして、また、本発明の DNA を増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15 bp~100bp、好ましくは 15bp~35bp の鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明の DNA の少なくとも一部若しくは全部の配列を有し、少なくとも 15bp の鎖長の DNA が用いられる。プライマーとして用いる場合、3' 側の領域は相補的である必要があるが、5' 側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。

また、本発明のポリヌクレオチドには、本発明の C-HEMBB1000317 蛋白質の発現を抑制するためのアンチセンスが含まれる。アンチセンスは、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも 15bp 以上、好ましくは 100bp、さらに好ましくは 500bp 以上の鎖長を有し、好ましくは 2000bp 以内の鎖長を有する。このようなアンチセンスは、例えば、配列番号：1 から 4 に記載の DNA の配列情報を基にホスホロチオネート法 (Stein, 1988 Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res 16, 3209-21 (1988)) などにより調製することが可能である。

本発明の DNA やそのアンチセンスには、例えば、遺伝子治療への応用が考えられる。本発明の DNA を利用した遺伝子治療の標的となる疾患としては、例えば、脳腫瘍が考えられる。これら分子を遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリボソームなどの非ウイルスベクターなどを利用して、*ex vivo* 法や *in vivo* 法などにより患者へ投与を行えばよい。

本発明は、また、本発明の蛋白質に結合する抗体を提供する。本発明の抗体の形態には特に制限はなく、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体または抗原結合性を有するそれらの一部も含まれる。また、全てのクラスの抗体が含まれる。さらに、本発明の抗体には、ヒト化抗体などの特殊抗体も含まれる。

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体の場合には、常法に従いアミノ酸配列に相当するオリゴペプチドを合成して家兎に免疫することにより得ることが可能であり (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.12~11.13)、一方、モノクローナル抗体の場合には、常法に従い大腸菌で発現し精製した蛋白質を用いてマウスを免疫し、脾臓細胞と骨髓腫細胞を細胞融合させたハイブリドーマ細胞の中から得ることができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4~11.11)。

本発明の蛋白質に結合する抗体は、本発明の蛋白質の精製に加え、例えば、これら蛋白質の発現異常や構造異常の検査・診断に利用することも考えられる。具体的には、例えば組織、血液、または細胞などから蛋白質を抽出し、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA 等の方法による本発明の蛋白質の検出を通して、発現や構造の異常の有無を検査・診断することができる。

本発明の蛋白質に結合する抗体は、本発明の蛋白質に関連した疾患の治療などの目的に利用することも考えられる。抗体を患者の治療目的で用いる場合には、ヒト抗体またはヒト化抗体が免疫原性の少ない点で好ましい。ヒト抗体は、免疫

系をヒトのものと入れ換えたマウス（例えば、「Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice, Mendez, M.J. et al.(1997) Nat.Genet.15:146-156」参照）に免疫することにより調製することができる。また、ヒト化抗体は、モノクローナル抗体の超可変領域を用いた遺伝子組換えによって調製することができる(Methods in Enzymology 203, 99-121(1991))。

また、本発明は、本発明の蛋白質に結合する化合物のスクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a) 本発明の蛋白質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、(b) 該蛋白質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、および(c) 該蛋白質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む。

具体的な方法としては、例えば、本発明の蛋白質のアフィニティーカラムに被検試料を接触させ精製する方法、two ハイブリッドシステムを利用する方法、ウエストウエスタンブロッティング法、ハイスループットスクリーニングによる方法など多くの公知の方法を利用することができる。また、BIAcore (Pharmacia 社) などの測定装置を利用して、本発明の蛋白質と被検化合物との結合を評価することによりスクリーニングを行うこともできる。スクリーニングに用いる被検試料としては、これらに制限されないが、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられる。

このスクリーニングにより単離される化合物は、本発明の蛋白質の活性を促進または阻害する化合物の候補となる。また、生体内において、本発明の蛋白質とこれと相互作用する分子との該相互作用を阻害する化合物の候補となる。

本発明の遺伝子、その蛋白質、該遺伝子の発現を制御する化合物、あるいは該蛋白質の活性を制御する化合物を医薬品として用いる場合には、それ自体を医薬品として用いることも可能であるが、公知の製剤学的方法により製剤化して用い

ることも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤などと適宜組み合わせて製剤化して用いることが考えられる。患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射など当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、DNA を治療薬として使用する場合には、該 DNA を遺伝子治療用ベクターに組み込み、患者に投与することも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能であろう。

図面の簡単な説明

図1は、ヒトおよびマウス由来の C-HEM BB1000317 のアミノ酸配列を整列した図である。整列 (アライメント) は、Clustal W1.7 (Nucleic Acids Research, 22, p4673-4680, 1994 年) を用いて行った。相同性の値は配列全体に対する一致した位置の割合 (%) を示す。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法 (Maniatis, T. et al. (1982) : "Molecular Cloning - A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) に従って実施可能である。

【実施例1】 オリゴキャップ法によるヒト10週齢胎児組織からのcDNAライブラリーの作製

ヒト10週齢胎児組織より、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)記載の方法によりmRNAを抽出した。さらに、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition

on, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)記載の方法にしたがって、オリゴ(dT)セルロースカラム (Collaborative labs) を用い、poly(A)+ RNAを精製した。

該poly(A)+ RNAより、オリゴキャップ法 [M. Maruyama and S. Sugano, Gene, 138: 171-174 (1994)]によりcDNAライブラリーを作製した。配列番号：9で表される配列からなるオリゴキャップリンカー (合成RNA) および配列番号：10で表される配列からなるオリゴ(dT)アダプターを用いて、文献 [鈴木・菅野, 蛋白質核酸 酵素, 41: 197-201 (1996)、Y. Suzuki et al., Gene, 200: 149-156 (1997)]に記載してあるようにBAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) 処理、TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) 処理、RNAライゲーション、第一鎖cDNAの合成とRNAの除去を行った。次いで、配列番号：11で表される5'末端側および配列番号：12で表される3'末端側のPCRプライマーを用い、PCR (polymerase chain reaction)により2本鎖cDNAに変換し、得られたDNA断片をSfiIで切断した。次いで、DraIIIで切断したベクターpME18SFL3 (GenBank AB009864) にcDNAの方向性を決めてクローニングし、cDNAライブラリーを作製した。pME18SFL3のクローン化部位は非対称性のDraIIIサイトとなっており、cDNA断片の末端にはこれと相補的なSfiI部位を付加しているため、クローン化したcDNA断片はSR α プロモーターの下流に一方方向性に挿入される。

【実施例2】 ヒト10週齢胎児組織から作製したcDNAライブラリー由来のcDNAクローンの解析

(1) cDNAクローンの単離

実施例1で作製したcDNAライブラリーの一部をジーンバルサー (Biorad社製) を用いてエレクトロポレーション法で大腸菌DH10B株に導入した。形質転換体は、アンピシリンを50 μ g/mL含有するLB寒天培地上で培養して選択した。これらの形質転換体をアンピシリンを50 μ g/mL含有するLB培地で一晚培養し、プラスミド自動抽出機PI100 (クラボウ社製) を用いてプラスミドを抽出した。

(2) 単離されたcDNAクローンの塩基配列の解析

これらの形質転換体より得たクローンのプラスミドDNAについて、DNAシーケンシング試薬(BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, PE Biosystems社製)を用い、マニュアルに従ってシーケンシング反応後、DNAシーケンサー(ABI PRISM 377, PE Biosystems社製)で各cDNAクローンの5'末端または3'末端からの塩基配列を解析した。

5'末端側からの塩基配列の決定には配列番号: 13で表されるME761FWを、3'末端側からの塩基配列の決定には配列番号: 14で表されるME1250RVをシーケンス用プライマーとして用いた。

(3) cDNAクローンの5'末端配列と3'末端配列のクラスター化

(2)で決定したcDNAクローンの5'末端配列と3'末端配列を、それぞれ別々にクラスタリングした。すなわち、cDNAクローンの決定した5'末端及び3'末端からのシングルパスシーケンスデータは、各配列データとの間でBLAST解析を行い、同一遺伝子に由来すると思われるクローンのグループ化を行った。5'末端配列では相同性95%以上のコンセンサス配列が300塩基対以上、3'末端配列では相同性90%以上のコンセンサス配列が200塩基対以上の場合、同一グループとした5'末端配列グループ3'末端配列グループはさらに、同一クローンの5'末端配列と3'末端配列が同一グループ(クラスター)に属するようグループ(クラスター)化処理を行った。

(4) cDNAクローン配列の特徴付け

クローン配列の5'末端配列データは、次の方法に基づいて特徴付けした。

- (1) GenBankを対象にしたBlastNによる相同性検索により、ヒトや他生物のmRNA配列(権利化された配列を含む)やヒトEST配列に対して同一であることを確認する。
- (2) ヒトmRNA配列やヒトEST配列より5'末端が長いことを確認する。
- (3) 全長性を予測するATGprプログラム [A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. Swindells. Assessing protein coding region integrity in cDNA sequencing proj

ects. Bioinformatics 14: 384-390 (1998)]により5'末端配列中のすべての開始コドンに由来するATGpr1、ATGpr2値を決定する。

(4) GenBankを対象にしたBlastNによる相同性検索により同一としたヒトEST配列数を決定する。

また、クローン配列の3'末端配列データの特徴付けは前出の(1)および(4)について行った。

これら特徴付けを行ったクローン配列のデータをもとに新規でかつ全長である可能性の高いcDNAクローンの選抜を行った。

(5) ヒトmRNA配列やヒトEST配列に対しての同一性5'末端の長さの比較

クローン配列の5'末端、および3'末端配列の、ヒトや他生物のmRNA配列に対する同一性は、各配列との比較配列部分の長さが200塩基以上で、94%以上一致の場合に同一と見なした。ヒトEST配列に対する同一性は5'末端配列との比較配列部分の長さが200塩基以上で、90%以上で一致の場合に同一と見なした。

ヒトmRNA配列を比較配列とし、5'末端の長さを比較する際には5'末端配列の長さがヒトmRNA配列より長い場合、または5'末端配列が翻訳開始コドンを含む場合、全長とした。比較対象配列がESTの場合には、データベース中のヒトEST配列より長く5'末端が伸びている場合、あるいは5'末端が短いクローンでも両者の差が50塩基以内である場合を便宜的に全長とし、それ以上短い場合を非全長とした。

(6) ATGprによる全長性の予測

全長性の予測にはATGpr [A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. Swindells. Assessing protein coding region integrity in cDNA sequencing projects. Bioinformatics 14: 384-390 (1998)] による解析結果を用いた。ATGpr1値は計算値から全長である可能性を予測する値であり、ATGpr1値が高いほど全長である可能性が高い。なお、最大ATGpr1値及び最大ATGpr2値とは、クローン配列の5'末端配列に含まれるすべての開始コドンから予測されるATGpr1値及びATGpr2値の最大値を示し、特徴付けにはこの値を用いた。

(7) 相同性検索による同一EST配列数からの新規性の予測

5'末端配列3'末端配列それぞれに対して、GenBankを用いた相同性検索から求めた。ヒトEST配列に対しては、5'末端配列との比較配列部分の長さが200塩基以上にわたって90%以上で一致する場合に同一とした。EST配列数はそのまま特徴付けに用い、新規性の指標とした。mRNA配列ばかりでなく、EST配列に対しても同一でない5'末端配列および3'末端配列をもつクローンは、新規な配列をコードする遺伝子である。同様に、同一のEST配列数が少ない5'末端配列、あるいは3'末端配列をもつクローンもまた、新規な配列をコードするcDNAクローンであると判定した。

(8) クラスターの特徴付け

5'末端配列3'末端配列をグループ化したクラスターを、次の観点に基づいて特徴付けした。

(1) GenBankを対象にしたBlastNによる相同性検索により、ヒトや他生物のmRNA配列（権利化された配列を含む）やヒトEST配列に対して同一であるか。

クラスターに含まれるすべての5'末端配列3'末端配列のうち、1配列でもmRNA配列に対して同一であった場合、そのクラスターはmRNA配列に対して同一なクラスターとした。

(2) ヒトmRNA配列やヒトEST配列より5'末端が長い。

クラスターに含まれるすべての5'末端配列がmRNA配列やヒトEST配列に対して非全長であった場合、そのクラスターはmRNA配列やヒトEST配列に対して非全長であるクラスターとした。

(3) 全長性を予測するATGprプログラムによる5'末端配列中のすべての開始コドンに由来するATGpr1値およびATGpr2値。

全長性を予測するATGprプログラム [A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. Swindells. Assessing protein coding region integrity in cDNA sequencing projects. Bioinformatics 14: 384-390 (1998)] による5'末端配列中のすべての開始

コドンに由来するATGpr1値は、クラスターに含まれる5'末端配列すべてに対してATGpr1値の最大値を、クラスターにおけるATGpr1値とした。ATGpr2値も同様にした。

(4) GenBankを対象にしたBlastNによる相同性検索により同一としたヒトEST配列数。

クラスターに含まれる5'末端配列3'末端配列それぞれに対してEST配列数の最大値を求め、クラスターにおける5'末端配列の同一EST配列数3'末端配列の同一EST配列数とした。

(9) 特徴付けからのクラスターの選抜方法

特徴付けにより得られたデータから、まず、ヒトや他生物のmRNA配列（権利化された配列を含む）と同一なクラスター、及び非全長なクラスターを除いた。それらクラスターの中から、次の条件のいずれかを満たすものを選抜した。

(a) クラスターにおける5'末端配列の同一EST配列数が20以下で、クラスターにおけるATGpr1値が0.3を越えるクラスター。

(b) クラスターにおけるATGpr1値が0.3以下のクラスターであっても、クラスターにおける5'末端配列の同一EST配列数が5以下で、かつ、クラスターにおける3'末端配列の同一EST配列数も5以下で、かつ、クラスター内に複数のクローンが含まれるクラスター。

(c) クラスターにおけるATGpr1値が0.3以下のクラスターであっても、クラスターにおける5'末端配列の同一EST配列数が0で、かつ、クラスターにおける3'末端配列の同一EST配列数が1以上であるクラスター。

(d) クラスターにおけるATGpr1値が0.3以下のクラスターであっても、クラスターにおける5'末端配列の同一EST配列数が1以上5以下で、かつ、クラスターにおける3'末端配列の同一EST配列数が0であるクラスター。

(a)で選抜されたクラスターには、少なくとも1クローンは新規性も、全長性も高いクローンが含まれている。(b),(c),(d)で選抜されたクラスターには、全長率

は低くなるものの、依然として全長で、新規なクローンが含まれている。

(10) クラスターからのクローンの選抜方法

同一クラスター内に1クローンしか含まないものについては、そのクローンを選抜した。同一クラスター内に複数のクローンを含む場合で、ATGpr1値が0.3より大のクローンが複数ある場合は、ATGpr1値がより大きい方のクローンを選択した。同一クラスター内に複数のクローンを含む場合で、ATGpr1値が0.3以下のクローンが複数ある場合、ATGpr2値が0.3より大ならば、ATGpr2値がより大きい方のクローンを選択した。また、同一クラスター内に複数のクローンを含む場合で、ATGpr1値、ATGpr2値ともに0.3以下でも、クラスター内でATGpr1値、ATGpr2値がともに最大値をとるクローンがあるならば、そのクローンを選択した。同一クラスター内に複数のクローンを含む場合で、上記のようなATGpr値での選抜ができなかった場合は、5'末端配列3'末端配列及びヒトEST配列を用いてアセンブルすることにより、より5'末端側に長いクローンを選抜した。アセンブルには、Sequencher (Gene Codes社製) 等を利用し、一部、アセンブルすることによっても決められなかった場合は、対象クローンすべてを全長と判断した。

(11) cDNAクローンの全長配列の解析

(1) ~ (10) のようにして選抜した、新規である可能性が高いと判断されたヒト10週齢胎児組織由来のcDNAクローンについて、全長cDNAの塩基配列を決定した。塩基配列は主に、カスタム合成DNAプライマーを用いたダイデオキシターミネーター法によるプライマーウォーキング (カスタム合成DNAプライマーを用い、PE Biosystem社製のDNAシーケンシング試薬でマニュアルに従ってシーケンシング反応後、同社製のシーケンサーでDNA塩基配列を解析) によって決定した。全長塩基配列は上記方法により決定された部分塩基配列を完全にオーバーラップさせ最終的に確定した。次に、決定された全長のcDNAの塩基配列から推定アミノ酸配列を求めた。

その一つであるcDNAクローンC-HEMBB1000317の塩基配列を配列番号: 1に示し

た。また全長塩基配列から推定されたcDNAクローンC-HEMBB1000317がコードする遺伝子産物のアミノ酸配列を配列番号：5に示した。

【実施例3】 ATGpr と ESTiMateFL での cDNA の 5'-末端の全長率の評価

ATGpr は、ATGコドンの周辺の配列の特徴から翻訳開始コドンであるかどうかを予測するためにヘリックス研究所のA. A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. Swindellsにより開発されたプログラムである [A. A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. Swindells, Bioinformatics, 14: 384-390 (1998); <http://www.hri.co.jp/atgpr/>]. 結果は、そのATGが真の開始コドンである期待値（以下ATGpr1と記載することもある）で表した（0.05-0.94）。このプログラムを全長率65%のオリゴキャップ法で作製したライブラリーからのcDNAクローンの5'-末端配列に適用してATGpr1値を0.6以上でクローンを選択した場合、全長クローン（ORFのN-末端までもつクローン）評価の感度と特異性はともに82~83%まで上昇した。HEMBB1000317のATGpr1値は0.27であった。

【実施例4】 高密度 DNA フィルターを用いた、ハイブリダイゼーションによる遺伝子発現解析

ナイロン膜スポット用のDNAは以下のように調製した。すなわち、大腸菌を96穴プレートの各ウェルに培養し（LB培地で37℃、16時間）、その培養液の一部を、96穴プレートの10μLずつ分注した滅菌水中に懸濁し、100℃で10分間処理した後、PCR反応のサンプルとして使用した。PCRはTaKaRa PCR Amplification Kit（宝社製）を用い、プロトコールに従って1反応20μLの反応溶液で行った。プラスミドのインサートcDNAを増幅するために、プライマーはシーケンシング用のプライマーME761FW（5' tacggaagtgttacttctgc3' / 配列番号：13）とME1250RV（5' tgtgggaggttttttctcta3' / 配列番号：14）のペア、またはM13M4（5' gttttccagtcacgac3' / 配列番号：15）とM13RV（5' caggaaacagctatgac3' / 配列番号：16）のペアを使用した。PCR反応は、GeneAmp System9600（PEバイオシステムズ社製）で、95℃5分間処理後、95℃10秒、68℃1分間で10サイクルし、

さらに 98°C20 秒間、60°C3 分間で 20 サイクル行い、72°C10 分間で行った。PCR 反応後、2 μ L の反応液を 1%アガロースゲル電気泳動して、臭化エチジウムで DNA を染色し、増幅した cDNA を確認した。増幅できなかったものは、その cDNA インサートをもつプラスミドを、アルカリ抽出法 (J Sambrook, EF Fritsh, T Maniatis, Molecular Cloning, A laboratory manual / 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) で調製した。

DNA アレイの作製は以下のように行った。384 穴プレートの各ウェルに DNA を分注した。ナイロン膜 (ベーリンガー社製) への DNA のスポッティングは、Biomek 2000 ラボラトリーオートメーションシステム (ベックマンコールター社製) の 384 ピンツールを用いて行った。すなわち、DNA の入った 384 穴プレートをセットした。その DNA 溶液に、ピンツールの 384 個の独立した針を同時に浸漬し、DNA を針にまぶした。その針を静かにナイロン膜に押し当てることによって、針に付着した DNA をナイロン膜にスポッティングした。スポットした DNA の変性および、ナイロン膜への固定は定法 (J Sambrook, EF Fritsh, T Maniatis, Molecular Cloning, A laboratory manual / 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に従って行った。

ハイブリダイゼーションのプロープとしては、ラジオアイソトープでラベリングした 1st strand cDNA を使用した。1st strand cDNA の合成は ThermoscriptTM RT-PCR System (GIBCO 社製) を用いて行った。すなわち、ヒトの各組織由来 mRNA (Clontech 社製) の 1.5 μ g と、1 μ L 50 μ M Oligo (dT)20 を用いて、50 μ Ci [α^{32} P]dATP を添加して付属のプロトコールに従って 1st strand cDNA を合成した。プロープの精製は、ProbeQuantTM G-50 micro column (アマシャムファルマシアバイオテック社製) を用いて付属のプロトコールに従って行った。次に、2 units E. coli RNase H を添加して、室温で 10 分間インキュベートし、さらに 100 μ g ヒト COT-1 DNA (GIBCO 社製) を添加して、97°C で 10 分間インキュベート後、氷上に静置してハイブリダイゼーション用のプロープとした。

ラジオアイソトープラベルしたプローブの、DNA アレイへのハイブリダイゼーションは、定法 (J Sambrook, EF Fritsh, T Maniatis, Molecular Cloning, A laboratory manual / 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に従って行った。洗浄は、ナイロン膜を洗浄液 1 (2X SSC, 1% SDS) 中で、室温 (約 26°C) で 20 分間のインキュベートを 3 回洗浄した後、洗浄液 2 (0.1X SSC, 1% SDS) 中で、65°C で 20 分間の洗浄を 3 回行った。オートラジオグラムは、BAS2000 (富士写真フイルム社製) のイメージプレートを用いて取得した。すなわち、ハイブリダイゼーションしたナイロン膜をサランラップに包み、イメージプレートの感光面に密着させて、ラジオアイソトープ感光用のカセットに入れて、暗所で 4 時間静置した。イメージプレートに記録したラジオアイソトープ活性は、BAS2000 を用いて解析し、オートラジオグラムの画像ファイルとして電子的に変換して記録した。各 DNA スポットのシグナル強度の解析は、Visage High Density Grid Analysis Systems (ジェノミックソリューションズ社製) を用いて行い、シグナル強度を数値データ化した。データは Duplicate で取得し、その再現性は 2 つの DNA フィルターを 1 つのプローブでハイブリダイゼーションして、両フィルターで対応するスポットのシグナル強度を比較した。全スポットの 95% が、相当するスポットに対して 2 倍以内のシグナル値であり、相関係数は $r=0.97$ である。データの再現性は十分といえる。

遺伝子発現解析の検出感度は、ナイロン膜にスポットした DNA に相補的なプローブを作製し、ハイブリダイゼーションにおける、プローブ濃度依存的なスポットのシグナル強度の増加を検討して見積もった。DNA としては、PLACE1008092 (GenBank Accession No. AF107253 と同一) を使用した。前述の方法で PLACE1008092 の DNA アレイを作製した。プローブとしては、PLACE1008092 の mRNA を *in vitro* 合成し、この RNA を鋳型として、前述のプローブ作製法と同様にして、ラジオアイソトープでラベリングした 1st strand cDNA を合成して使用した。PLACE1008092 の mRNA を *in vitro* 合成するために、pBluescript SK(-) の T7 プロモーター

側に PLACE1008092 の 5' 末端が結合されるように組換えたプラスミドを造成した。すなわち、pME18SFL3 の制限酵素 DraIII 認識部位に組み込まれた PLACE1008092 を、制限酵素 XhoI で切断して PLACE1008092 を切り出した。次に XhoI で切断してある pBluescript SK(-)と、切り出した PLACE1008092 を DNA ligation kit ver.2 (宝社製) を用いてライゲーションした。pBluescript SK(-)に組換えた PLACE1008092 の mRNA の in vitro 合成は、AmpliscribeTM T7 high yield transcription kit (Epicentre technologies 社製) を用いて行った。ハイブリダイゼーションおよび各 DNA スポットのシグナル値の解析は、前述の方法と同様に行った。プローブ濃度が $1 \times 10^7 \mu\text{g/mL}$ 以下では、プローブ濃度に比例したシグナル増加が無いことから、この濃度域でのシグナルの比較は困難と考えられ、シグナル強度が 40 以下のスポットは一様に低レベルのシグナルとした。 $1 \times 10^7 \sim 0.1 \mu\text{g/mL}$ の範囲でプローブ濃度依存的なシグナル値の増加があり、検出感度としてはサンプルあたり発現量比が 1:100,000 の mRNA の検出感度である。この解析の結果、HEM BB1000317 は少なくとも 1 つの組織で発現が認められた。

[実施例 5] 紫外線傷害関連遺伝子の解析

紫外線は健康に少なからず影響を及ぼすことが知られている。近年はオゾン層破壊に伴って紫外線傷害にさらされる機会が多くなっており、皮膚癌などの危険因子として認識されてきている (United States Environmental Protection Agency: Ozone Depletion Home Page、<http://www.epa.gov/ozone/>)。紫外線が皮膚表皮細胞に作用して発現変化する遺伝子は、皮膚の紫外線傷害に関すると考えられる。

紫外線照射した初代培養皮膚由来線維芽細胞を培養して、発現変化する遺伝子を探索した。初代培養皮膚由来線維芽細胞 (Cell Applications 社製) は、培養皿にコンフルエントに培養して、254 nm の紫外線を $10,000 \mu\text{J/cm}^2$ 照射した。細胞からの mRNA の抽出は、未照射の細胞、照射後 4 時間または 24 時間培養した細胞を対象に、FastTrackTM 2.0 mRNA isolation kit (Invitrogen 社製) を用い

て行った。ハイブリダイゼーション用のプローブのラベリングは、この mRNA 1.5 μ g を用いて、前記の方法で同様にして行った。データは $n = 3$ で取得し、紫外線刺激ありの細胞のシグナル値と、なしの細胞のシグナル値を比較した。比較には二標本 t 検定の統計処理を行って、シグナル値の分布に有意に差があるクローンを、 $p < 0.05$ で選択した。本解析は、シグナル値の低いクローンであっても差を統計的に検出できる。したがって 40 以下のシグナル値のクローンに対しても評価を行った。

紫外線未照射の皮膚由来線維芽細胞、および紫外線照射した皮膚由来線維芽細胞の、各 cDNA の発現を測定した。

それぞれ細胞の各遺伝子についてシグナル値の平均 (M_1, M_2) と標本分散 (s_1^2, s_2^2) を求め、比較する 2 つの細胞の標本分散から合成標本分散 s^2 を求めた。 $t = (M_1 - M_2)/s/(1/3+1/3)^{1/2}$ を求めた。自由度 4 として t 分布表の有意水準の確率 P である 0.05 と 0.01 の t 値と比較して、値が大きい場合にそれぞれ $P < 0.05$ 、または $P < 0.01$ で両細胞の遺伝子の発現に差があると判定した。この解析の結果、H EMBB1000317 は、紫外線照射によって、4 時間後または 24 時間後に発現が減少した。

【実施例 6】 推定アミノ酸配列に対するシグナル配列、膜貫通領域および機能ドメインの検索

HEMBB1000317 の推定アミノ酸配列に対して、アミノ末端のシグナル配列の有無と膜貫通領域の有無を予測、さらに蛋白質の機能ドメイン (モチーフ) 検索を行った。アミノ末端のシグナル配列については PSORT [K. Nakai & M. Kanehisa, Genomics, 14: 897-911 (1992)] を、膜貫通領域については SOSUI [T. Hirokawa et. al. Bioinformatics, 14: 378-379 (1998)] (三井情報開発株式会社販売) を用いて解析を行った。機能ドメインの検索については Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いた。PSORT や SOSUI により、アミノ末端のシグナル配列や膜貫通領域が予測されたアミノ酸配列は分泌、膜蛋白質であると

予測された。また、Pfamによる機能ドメイン検索において、ある機能ドメインにヒットしたアミノ酸配列はヒットデータをもとに、例えばPROSITE(<http://www.expasy.ch/cgi-bin/prosite-list.pl>)にある機能カテゴリー分類を参照にしてその蛋白質の機能予測することができる。また、PROSITEでの機能ドメインの検索も可能である。

Pfamにより HEMBB1000317 の推定アミノ酸配列には、EGF-like domain (EGF 様ドメイン)、並びに Thrombospondin type 1 domain (TSP1 ドメイン) が検出された。

[実施例 7] 全長配列による機能カテゴリー分類

HEMBB1000317 について GenBank、Swiss-Prot、UniGene の各データベースを対象に行った相同性検索の結果や、全長塩基配列から推定されたアミノ酸配列に対するドメイン検索の結果から、クローン中にコードされるタンパク質の機能予測、カテゴリー分類を行った。その結果、HEMBB1000317 は、分泌・膜タンパク質、および糖タンパク質関連タンパク質に分類された。

[実施例 8]

A. ドメイン解析

C-HEMBB1000317 蛋白のドメイン解析を行った。すなわち、cDNA から推定されたアミノ酸配列（配列番号：5）に関して、BLAST2.0 (Nucleic Acids Res., 25(17), p3389-3402, 1997) を用いてホモロジー検索を行い、GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) に登録されている既知のアミノ酸配列またはドメインとの比較検討を行った。

同配列から予想されるアミノ酸配列は、TSP1 ドメインの 2 回繰返し構造および EGF 様ドメインの 7 回繰返し構造と思われる領域を有している。アミノ酸配列とドメインとの関係を表 1 に示す。

表 1

開始位置	終了位置	アミノ酸数	ドメイン
1 8 (T)	7 4 (P)	5 7 AA	TSP1 1
7 5 (V)	1 3 1 (P)	5 7 AA	TSP1 2
3 6 7 (C)	4 0 6 (T)	4 2 AA	EGF様1
4 0 7 (C)	4 5 1 (S)	4 5 AA	EGF様2
4 5 2 (C)	4 8 9 (K)	3 8 AA	EGF様3
4 9 0 (C)	5 3 1 (T)	4 2 AA	EGF様4
5 3 2 (C)	5 7 4 (P)	4 3 AA	EGF様5
5 7 5 (C)	6 1 4 (T)	4 0 AA	EGF様6
6 1 5 (C)	6 6 0 (F)	4 6 AA	EGF様7

TSP1 は血管新生抑制作用を有することが報告されている(J.Biol.Chem., 122, p497-511, 1993 年)。本発明の cDNA において TSP1 ドメインの存在が確認されたことから、当該 cDNA によってコードされる蛋白質は、TSP1 様の蛋白質として血管新生抑制作用を有することが示唆される。

B. 全長配列での検索結果

C-HEMBB1000317 の全長アミノ酸配列での GenBank に対する BLAST2.0 (前記) を用いた検索結果を表 2 に示した。ただし、E-value が e-50 以下のもののみとした。

表 2

HIT(ID)	E-value	相同性 (%)	Description
AF051401	3e-62	37	fibulin-1 isoform D (Caenorhabditis elegans)
P37888	3e-61	37	fibulin-1D (Human)
AL050095	2e-58	36	hypothetical protein (homo sapiens)
P22064	5e-58	42	latent transforming growth factor beta binding protein 1 (Human)
P23144	1e-57	40	fibulin-1 isoform C (Homo sapiens)
P23142	1e-57	39	fibulin-1 isoform A (Homo sapiens)
P23143	1e-57	39	fibulin-1 isoform B (Homo sapiens)
AB011532	2e-52	37	MEGF6 (Rattus)
Q61549	7e-51	39	cell surface glycoprotein EMR1 (M.musculus)

ヒットした配列とはEGF様ドメインに相同性があることが分かった。

C. ドメイン単位での検索

既知のドメインとのアミノ酸配列上で比較検討を行った。方法は前項と同様である。結果を表3に示す。

表 3

ドメイン名	ヒットした既知のアミノ酸配列		
	ID	説明	相 同 性 (%)
TSP1 1	AI543270	drosophila melanogaster cDNA clone	75
TSP2 1,	P35440	thrombospondin 1 chicken	52
EGF-like1	AW328775	EST0077 normalized cDNA library Gallus cDNA clone	84
EGF-like2	AA991689	Homo sapiens cDNA clone 3' similar to FIBRILLIN 2	58
EGF-like3	AW328775		78
EGF-like4	U04441	Human glycoprotein 330	51
EGF-like5	AW328775		83
EGF-like6	AA670102	Homo sapiens cDNA clone 5' similar to F IBLIN-2	77
EGF-like7	T86312	Homo sapiens cDNA clone 5' similar to F IBLIN-1, isoform D	97
	T93939	Homo sapiens cDNA clone 5' similar to F IBLIN-1, isoform C	100
	AA166247	Mus musculus sapiens cDNA clone 5' simi lar to FIBLIN-1, isoform D	93

マウスホモログのものと思われるESTが見出された。

[実施例 9]

C-HEMBB1000317 遺伝子の発現組織を解析を解析するため、下記のPCRプライマーを合成した。

KY03-S05

sense

; CCAATCGCATGTGCTTCAAC / 配列番号 : 17

KY03-A05 antisense ; TGGCTATTCCAAATGGGAGG / 配列番号: 1 8
 KY03-A06 antisense ; CTCAGAAGTACCAAGGAAGG / 配列番号: 1 9

次に 24 種のヒト臓器の mRNA に由来する cDNA を 4 種の濃度で 96 ウェルプレート中に調製した「ヒト RAPID-SCAN™ GENE EXPRESSION PANEL」(OriGene Technologies, Inc.) を鋳型として、下記の酵素溶液(25 μ L/ウェル)を添加し、ミネラルオイルを適量(約 25 μ L)重層した。なお、プライマーは KY03-S05/ KY03-A05 の組み合わせで 186 bp の DNA 断片が増幅され、KY03-S05/ KY03-A06 の組み合わせでは 608 bp の DNA 断片が増幅される。

試薬	容量	最終濃度
10x EX Taq buffer	2.5 μ L	1x
dNTP (2.5 mM each)	2.0 μ L	0.2 mM
10 μ M sense primer	1.0 μ L	0.4 μ M
10 μ M antisense primer	1.0 μ L	0.4 μ M
Distilled Water	18.25 μ L	
EX Taq polymerase(5U/ μ L)	0.25 μ L	0.05U/ μ L

計 25 μ L

酵素溶液を各ウェルに添加後、プレートをプラスチックカバーシートで被い、15 分間静置後、サーマルサイクラー (PCR Thermal Cycler MP : 宝酒造) にセットし、以下の運転プログラムで PCR 反応させた。すなわち、94°C 2 分間を 1 サイクル \rightarrow 94°C 30 秒間、60°C 30 秒間、72°C 30 秒間を 35 サイクル \rightarrow 72°C 10 分間を 1 サイクル、とした。

PCR 反応終了後、PCR 産物 5 μ L を 1 μ L の 10x 泳動用緩衝液 (宝酒造の制限酵素に添付) と混合し、泳動装置 Mupid (コスモバイオ) にセットした 3% アガロース

ゲル (SeaKem GTG agarose : FMC BioProducts : 1 μ g/mL のエチジウムブロマイドを含む) にアプライし 100 V の定電圧で約 45 分間泳動後、紫外線照射下で泳動像を観察した。なお、泳動用緩衝液にはトリス-ホウ酸緩衝液 (宝酒造) を用いた。結果を表 4 に示す。なお PCR 産物は、RAPID-SCAN プレート中 1.0 ng の cDNA を含む濃度系列にのみ観察され、それ以下の濃度系列では得られなかった。

表 4

発現の強さ	組織名
++	脳、心臓、腎臓、脾臓、肝臓、肺、骨格筋、胃、精巣 胎盤、甲状腺、副腎、卵巣、前立腺、皮膚、胎児肝臓
+	小腸、唾液腺、胎児脳
±	結腸、膵臓、子宮、白血球、骨髄

++ : 強いバンドが観察された

+ : 弱いバンドが観察された

± : 非常に弱いバンドが観察された

C-HEM BB1000317 遺伝子は、脳、心臓、腎臓、脾臓、肺、骨格筋、胃、精巣、胎盤、甲状腺、副腎、卵巣、前立腺、皮膚で発現しており、それに続いて小腸、唾液腺、甲状腺では弱い発現が見られ、さらに結腸、膵臓、子宮、白血球、骨髄では発現レベルが低かった。また胎児肝臓でも発現が見られ、胎児脳でも弱い発現が観察された。

[実施例 10]

C-HEM BB1000317 遺伝子の病態との関与を解析することを目的として、ヒトの脳がん組織における発現量と正常脳組織における発現量とを比較検討した。

PCR 増幅用のプライマーとして、C-HEM BB1000317 遺伝子の増幅には、前の実施例で用いた KY03-S05 primer (Sense Primer) および KY03-A06 primer (Antisense Primer) を用いた。本プライマーセットを用いた場合には、608 bp の DNA 断

片が増幅される。また、コントロール遺伝子として用いたヒト glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) の発現解析には、市販のプライマーセット (CLONTECH 社製, Code.No.5405-1) を用いた。本プライマーを用いた場合には、450 bp の DNA 断片が増幅される。

脳腫瘍組織および正常ヒト脳組織由来 cDNA としては、BioChain Institute より購入した、「Brain Normal、Code.No.0510005、Lot.No.A301089」および「Brain Tumor (Glioma)、Code.No.0540004、Lot.No.A208105」を用いた。それぞれの cDNA 原液を TE 溶液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) で 10 倍希釈した後、さらに 1/2 倍希釈操作を順次 7 回繰り返して、希釈が 1 倍、1/2 倍、 $(1/2)^2$ 倍、 $(1/2)^3$ 倍、 $(1/2)^4$ 倍、 $(1/2)^5$ 倍、 $(1/2)^6$ 倍、 $(1/2)^7$ 倍の系列を作製し、それぞれの溶液 5.0 μ L を鋳型 DNA とした。PCR 反応には、宝酒造製「TaKaRa Ex Taq™、CodeNo.RR001A」に添付されている 10 x PCR Buffer、dNTP 溶液 (2.5 mM each)、および Ex Taq Polymerase を用いて行った。反応の組成を以下に示した。

PCR 反応組成 (C-HEM BB1000317 遺伝子解析用)

試薬	容量	最終濃度
10x EX Taq buffer	5.0 μ L	1x
dNTP (2.5 mM each)	4.0 μ L	0.2 mM
50 μ M KY03-S05 primer	0.2 μ L	0.2 μ M
50 μ M KY03-A06 primer	0.2 μ L	0.2 μ M
Distilled Water	35.35 μ L	
EX Taq polymerase (5U/ μ L)	0.25 μ L	0.025U/ μ L

計 45 μ L

P C R 反応組成 (G3PDH 遺伝子解析用)

試薬	容量	最終濃度
10x EX Taq buffer	5.0 μ L	1x
dNTP (2.5 mM each)	4.0 μ L	0.2 mM
100 μ M GPDHS2 primer	0.1 μ L	0.2 μ M
100 μ M GPDHA2 primer	0.1 μ L	0.2 μ M
Distilled Water	35.55 μ L	
EX Taq polymerase(5U/ μ L)	0.25 μ L	0.025U/ μ L

計 45 μ L

PCR チューブに各 cDNA 溶液を分注し、上述した酵素/プライマー溶液を各チューブに添加後、サーマルサイクラー (PCR Thermal Cycler MP : 宝酒造製) にセットし、以下の運転プログラムで PCR 反応させた。すなわち、94°C2 分間を 1 サイクル \rightarrow 94°C30 秒間、60°C30 秒間、72°C30 秒間を 40 サイクル (C-HEMBB1000317) または 20 サイクル (G3PDH) \rightarrow 72°C10 分間を 1 サイクル、とした。

PCR 反応終了後の処理は前の実施例に準じて行った。その結果を表 5 および表 6 に示す。

表 5

(C-HEM BB1000317 の場合)

希釈倍数	正常脳	脳腫瘍
1	+	+
1/2	+	+
1/4	+	+
1/8	+	+/-
1/16	+	-
1/32	+	-
1/64	+/-	-
1/128	+/-	-

+ : バンドが観察された

+/- : バンドが若干観察された

- : バンドが観察されない

表 6

(G3PDH の場合)

	正常脳	脳腫瘍
1	+	+
1/2	+	+
1/4	+/-	+
1/8	-	+/-
1/16	-	-
1/32	-	-
1/64	-	-
1/128	-	-

+、-、+/- の定義は前記と同じである。

表 5 で示したように、脳腫瘍における C-HEM BB1000317 遺伝子の発現量を PCR 法を用いて解析し、正常成人脳組織における発現量と比較した。遺伝子の発現量の概算は、それぞれの脳に由来する cDNA サンプルを $(1/2)^n$ 希釈した後に PCR を行い、その結果得た PCR 産物のアガロースゲル上での濃度を可視的に比較すること

により行った。コントロール遺伝子として、G3PDH 遺伝子についても同様に解析した。その結果、がん組織では C-HEMBB1000317 遺伝子の発現量が約 1/8 に低下していることが示された。コントロールである G3PDH 遺伝子の発現量は逆に正常組織の方が約 1/2 程度低い (表 6) ことから換算すると、がん組織では、C-HEMBB1000317 遺伝子の発現量が約 1/10 以下に低下していることが示された。この結果は、C-HEMBB1000317 遺伝子が脳腫瘍に関連する遺伝子であることを示唆するものである。

本発明の遺伝子は脳腫瘍では発現が低下することが確認された。この結果から、本発明の cDNA は、腫瘍、特に脳腫瘍の診断に、あるいは、腫瘍、特に脳腫瘍の予防・治療剤のスクリーニングに有用であることが期待される。

[実施例 11]

ヒト新規 cDNA である C-HEMBB1000317 のマウスカウンターパートを取得することを目的として、以下の操作を行った。

1) マウス cDNA ソースを鋳型として、ヒト C-HEMBB1000317 cDNA 特異的プライマーを用いて C-HEMBB1000317 マウスカウンターパート cDNA 断片を増幅した。

ヒト C-HEMBB1000317cDNA 塩基配列 (配列番号: 1) に対して特異的に設計・合成した 6 組のプライマーペア:

ペア 1 KY03-S09: ATGCGAAGGGAGTGATGTCC / 配列番号: 20

 KY03-A02: GCAGGTGACTGAAGCTGTAG / 配列番号: 21

 ヒト増幅産物長 789bp

ペア 2 KY03-S09: ATGCGAAGGGAGTGATGTCC / 配列番号: 22

 KY03-A03: TCTTCCATCTGCAGCTATGG / 配列番号: 23

 ヒト増幅産物長 1216bp、

ペア 3 KY03-S01: GGAGGAGGTGAAAAGACTCG / 配列番号: 24

KY03-A03 : TCTTCCATCTGCAGCTATGG / 配列番号 : 2 5

ヒト増幅産物長 939bp

ペア 4 KY03-S01 : GGAGGAGGTGAAAAGACTCG / 配列番号 : 2 6

KY03-A04 : ATATCTGCACTGATGGGTCC / 配列番号 : 2 7

ヒト増幅産物長 1365bp

ペア 5 KY03-S02 : CAAGTGGAATTTGCAACTGG / 配列番号 : 2 8

KY03-A04 : ATATCTGCACTGATGGGTCC / 配列番号 : 2 9

ヒト増幅産物長 978bp

ペア 6 KY03-S02 : CAAGTGGAATTTGCAACTGG / 配列番号 : 3 0

KY03-A05 : TGGCTATTCCAAATGGGAGG / 配列番号 : 3 1

ヒト増幅産物長 1401bp

を用い、マウス精巣由来 QUICK-Clone cDNA (Clontech 社) を鋳型として、KOD Dash (東洋紡) を用い添付プロトコルに従い PCR を行ったところ、ペア 3、ペア 4、ペア 5、ペア 6 の 4 組についてそれぞれヒト増幅産物とほぼ同じ約 950bp、約 1.4Kbp、約 1Kbp、約 1.4Kbp の増幅産物が確認された。

2) マウスカウターパート cDNA 断片のクローニング

ペア 4 およびペア 6 の増幅産物をアガロースゲルで電気泳動し、QIA Quick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) を用いて添付プロトコルに従い、それぞれの DNA 断片を回収した。回収した DNA を Zero Blunt™ TOPO™ PCR Cloning Kit (Invitrogen 社) を用いて、添付プロトコルに従い、それぞれ添付のプラスミドベクター pCR®-BluntII-TOPO に連結した後、添付の TOP10 コンピテント細胞に導入し、大腸菌形質転換体を得た。得られたそれぞれの大腸菌形質転換体を、終濃度 25 µg/mL

の硫酸カナマイシン（ナカライテスク社）を含む Terrific Broth 培地で培養し、プラスミドを QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN 社)で抽出した。

3) マウスカウンターパート cDNA 断片の 5'および 3'末端の塩基配列決定
抽出したプラスミドの塩基配列決定用サンプルは、プラスミドベクター pCR®-BluntII-TOPO にアニーリングするプライマー

SP6Primer: CTATTAGGTGACACTATAG/配列番号: 3 2

T7Primer: GTAATACGACTCACTATAGGGC/配列番号: 3 3

を用いて、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE Biosystems 社)にて添付プロトコルに従い調製した。調製したサンプルは、キャピラリー電気泳動式塩基配列解析装置 ABI PRISM® 310 ジェネティックアナライザ (PE Biosystems 社)で解析し、当該 DNA の塩基配列を決定した。得られたペア 4 およびペア 6 の増幅産物の 5'および 3'塩基配列は相互にオーバーラップしており、1本の cDNA 断片に連結された。連結されたマウス cDNA 断片の配列は配列番号: 2に、それより推定されたアミノ酸配列は配列番号: 6に示す。

4) マウス cDNA 特異的プライマーを用いたハイブリダイゼーションによる、マウス cDNA ライブラリのスクリーニング

GeneTrapper cDNA Positive Selection Systems (Life Technologies 社)を用いて、添付プロトコルに従い Mouse Testis SuperScript™ cDNA Library (Life Technologies 社)から mC-HEMBB1000317 cDNA を単離するためのスクリーニングを行い、大腸菌形質転換体を得た。添付プロトコルにて、一本鎖化した標的遺伝子のハイブリダイゼーション用および二本鎖への修復用として用いる為の標的遺伝子特異的に設計するよう指定されたオリゴヌクレオチドプライマーは、連結されたマウス cDNA 断片の配列より、

m03-S01: AAGCGACTATGTGACAATCCAGTGC/配列番号: 3 4

m03-S02: ACCCAGGTCTCCAGATGTAACATGC/配列番号: 3 5

の2本を設計・合成した。なお、一本鎖化した標的遺伝子のハイブリダイゼーシ

ョンには m03-S01 および m03-S02 をそれぞれ別個に用い、二本鎖への修復にもう一方を用いた。得られた大腸菌形質転換体を KY03-S01 および KY03-A04 をプライマーとして KOD Dash を用いたコロニーPCR にて再スクリーニングを行った結果、1 個のマウス C-HEMBB1000317 cDNA クローンを得た。得られた大腸菌形質転換体を、終濃度 50 μ g/mL のアンピシリン (ナカライテスク社) を含む Terrific Broth 培地で培養し、プラスミドを QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN 社) で抽出した。

5) ライブラリ由来マウス cDNA の全塩基配列決定

抽出したプラスミドの塩基配列決定用サンプルは、Mouse Testis SuperScript[™] cDNA Library 作製に使用されているプラスミドベクター pCMV-SPORT2 にアニーリングする SP6Primer および T7Primer、マウス cDNA 断片配列 (配列番号: 2) から設計・合成したプライマー

- m03-S03 : AAGCGACTATGTGACAATCC / 配列番号 : 3 6
- m03-S04 : TGGCTTTACCCTCACTAACG / 配列番号 : 3 7
- m03-S05 : TTAGTAGAGACACTTCATGC / 配列番号 : 3 8
- m03-S06 : GACTGTGACAACACCATTTGG / 配列番号 : 3 9
- m03-S07 : GCATTGACATAGATGAGTGC / 配列番号 : 4 0
- m03-S08 : CCAATGACTTGGAATGTACC / 配列番号 : 4 1
- m03-A01 : GCATGTTACATCTGGAGACC / 配列番号 : 4 2
- m03-A02 : CCTCTCCAGTTGCAAATTC / 配列番号 : 4 3
- m03-A03 : CCAGTGCTCTTCTAGTTGG / 配列番号 : 4 4
- m03-A04 : AACCCATCAGAGGTTCTTCG / 配列番号 : 4 5
- m03-A05 : TCGTGTTCTCACATATTTGG / 配列番号 : 4 6
- m03-A06 : CAAGGCATATGGGCTTAAGG / 配列番号 : 4 7

ヒト C-HEMBB1000317cDNA 塩基配列で公共 DB を検索し得られたマウス EST 配列 (AA166247) から設計・合成したプライマー

m03-S09 : GCTGGTTGCATACACACAGG / 配列番号 : 48

および本クローンの配列から設計・合成したプライマー

m03-A07 : ATACCAAAATGTCAAGACCC / 配列番号 : 49

m03-A08 : GAAAGTCACTTTCTGATACC / 配列番号 : 50

を用いて、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE Biosystems 社)にて添付プロトコルに従い調製した。調製したサンプルは、キャピラリー電気泳動式塩基配列解析装置 ABI PRISM® 310 ジェネティックアナライザ (PE Biosystems 社)で解析し、当該 DNA の全塩基配列を決定した。その結果、推定アミノ酸配列の C 末端はヒト C-HEMBB1000317 と一致した。得られたマウス C-HEMBB1000317cDNA 塩基配列は配列番号 : 3 に、それより推定されたアミノ酸配列は配列番号 : 7 に示す。また、ヒト由来クローンとマウス由来クローンの各々の推定アミノ酸配列を比較した結果を図 1 に示す。

6) 5'RACE 法によるマウス 5'側 cDNA の取得

得られた mC-HEMBB1000317cDNA クローンは hC-HEMBB1000317 クローンより 5'末端が短かったため、Mouse Lung Marathon-Ready™ cDNA (Clontech 社)を用いて、添付プロトコルに従い 5'RACE 法によるマウス 5'側 cDNA の取得を行った。添付プロトコルにて、第一次 PCR および第二次 PCR に用いる為の、標的遺伝子特異的に設計するよう指定された 2 種のオリゴヌクレオチドプライマーは、m03-S04 を第一次 PCR、m03-S02 を第二次 PCR にそれぞれ使用した。5'RACE 法の結果、約 600bp から約 3Kbp 付近にスメアーな増幅産物が得られた。増幅産物をアガロースゲルで電気泳動し、QIA Quick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社)を用いて添付プロトコルに従い、約 1~3Kbp に相当する部分のゲルから DNA 断片を回収した。回収した DNA を Zero Blunt™ TOP0™ PCR Cloning Kit (Invitrogen 社)を用いて、添付プロトコルに従い、それぞれ添付のプラスミドベクター pCR®-BluntII-TOPO に連結した後、添付の TOP10 コンピテント細胞に導入し、大腸菌形質転換体を得た。得られたそれぞれの大腸菌形質転換体を、終濃度 25 µg/mL の硫酸カナマイシン (ナカ

ライテスク社)を含む Terrific Broth 培地で培養し、プラスミドを QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN 社)で抽出した。

7) マウス 5'側 cDNA の塩基配列決定

抽出したプラスミドの塩基配列決定用サンプルは、SP6Primer および T7Primer を用いて、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PE Biosystems 社)にて添付プロトコルに従い調製した。調製したサンプルは、キャピラリー電気泳動式塩基配列解析装置 ABI PRISM[®] 310 ジェネティックアナライザ (PE Biosystems 社)で解析した。得られた 5'RACE 断片の塩基配列は、マウス cDNA 塩基配列 (配列番号: 3) および他の 5'RACE 産物の塩基配列とのオーバーラップを確認し、互いに連結した。得られた 5'RACE;+マウス cDNA 塩基配列は配列番号: 4に、それより推定されたアミノ酸配列は配列番号: 8に示す。

配列番号: 8のアミノ酸配列は、TSP1 ドメインの6回繰返し構造およびEGF様ドメインの7回繰返し構造と思われる領域を有していた。また、ヒト由来クローンとマウス由来クローンの各々の推定アミノ酸配列を比較した結果を図1に示す。ヒトとマウスの相同性は90%であった。

マウス由来の cDNA が見出されたことから、当該 cDNA は、ノックアウトマウスの調製、同マウスを用いた脳腫瘍モデルの調製、同モデルを用いた脳腫瘍の予防・治療薬のスクリーニング等への適用が期待される。

産業上の利用の可能性

本発明により、新規な蛋白質 (C-HEMBB1000317)、当該蛋白質をコードする遺伝子、当該遺伝子を含むベクター、当該ベクターを含む宿主細胞、当該蛋白質の製造方法が提供された。さらに、本発明の遺伝子は、脳腫瘍の診断、あるいは脳腫瘍の予防・治療剤の開発に有用なことが期待される。

請求の範囲

1. 下記 (a) から (d) のいずれかに記載のDNA。
 - (a) 配列番号：5 から 8 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA。
 - (b) 配列番号：1 から 4 のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含むDNA。
 - (c) 配列番号：5 から 8 のいずれかに記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：5 から 8 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNA。
 - (d) 配列番号：1 から 4 のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、配列番号：5 から 8 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNA。
2. 配列番号：5 から 8 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードするDNA。
3. 請求項 1 または 2 に記載のDNAによりコードされる蛋白質またはペプチド。
4. 請求項 1 または 2 に記載のDNAが挿入されたベクター。
5. 請求項 1 または 2 に記載のDNAまたは請求項 4 に記載のベクターを保持する形質転換体。
6. 請求項 5 に記載の形質転換体を用いて蛋白質またはペプチドを発現させる工程および発現させた蛋白質またはペプチドを回収する工程を含む、請求項 3 に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法。
7. 請求項 3 に記載の蛋白質またはペプチドに結合する抗体。
8. 配列番号：1 から 4 のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド。

9. 請求項3に記載の蛋白質またはペプチドに結合する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 該蛋白質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該蛋白質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程

(c) 該蛋白質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

10. 請求項1若しくは2に記載のDNA、請求項3に記載の蛋白質若しくはペプチド、または請求項4に記載のベクターを含有する医薬組成物。

1 / 1

☒ 1

>上段: ヒト
>下段: マウス
相同性 90 %

.....
VDAGGRVILDCQAAGEPQPTITWSRQGPISWDNRLSMLPNSSLYIAAARKEDTSEYECV
.....
ARNLMGSVLVRVPVIVQVHGGFSLWSAWRPCSVTCGKGIQKRSRLCDNPPANGGRPCQG
.....
ADSEARHCHNKLCPVDGHWSEWSFWECDSCRSCGHGNQTRTRTCNPPAQHGGRPCEGHAV
.....
ETIMCNI RPCPVHGVWNAWQPWSACSKSCGKSQTRMRLCNNPPPSFGGAHCSGAETQMQ
.....CEGSDVQSDFCN
VCNERHCPVDGRWATWSSWSACTVSCGGGARKRTRDCSDPVPQYGGNKCEGTGVQSDFCN
SDPCPTHGNWSPWSGWRTCSRTCNGGOMRRYRTCDNPPPSNGGRACGGPDSQIQRCDTM
SDPCPTHGNWSPWSGWTCRTCNGGOMRRYRTCDNPRPSNGGRACGGPDTQIQRCDTM
CPVDGSGWSHWSQCSASC GGGEKTRKRLCDHPVPVKGGRPCPGD TTQVTRCNVQACPG
CPVDGSGWTWHSWHSVC GGGERTRKRLCDNPVPTKGGRSCPGDATQVSRCNMQACPG
GQQRARGSVIGNINDVEFGIAFLNATITDSPNSDTRIIRAKITNVPRSLGSAMRKIVSIL
GQQRARGSVIGNINDIEFGIAFLNATITDSPNTDTRVIQAKITNVPRSLGPAMRKIISIL
NPIYWTTAKEIGEAVNGFTLTNAVFKRETQVEFATGEILQMSHIARGLDSDGSLLLDIVV
NPIYWTTAKEIGEAVNGFTLTNAVFKRETQVEFATGEVLRMTHVARGLDSDGALLLDVIV
SGYVLQLQSPA EVTVKDYTEDYIQTGPGQLYAYSTR LFTIDGISIPYTNHTVFYDQAQG
SGQVLQLHSPA EVGVKDYTEDYIQTGPGQLYAYSTR LFTIDGISIPYTNHTIFYDQAWG
RMPFLVETLHASSVESDYNQIEETLGFKIHASISKGDRSNQCPSGFTLDSVGPFCADEDE
KMPFLVETLHASSIESDYNQLEETLGFKIHASISKGDRSNQCPSGFILDSVGPFCADEDE
CAAGNPCSHSCHNAMGTYYCSPKGLTIAADGRTCQDIDECALGRHTCHAGQDCDNTIGS
CTAGNPCSHTCHNAIGAYYCSPKGLTIAADGRTCQDIDECALGGHTCRAGQDCDNTIGS
YRCVVRCGSGFRRTSDGLSCQDINEQESSPCHQRCFNAIGSFHCGCEPGYQLKGRKCMD
YRCVVHCGTGFRRTSDGLSCQDINEQESSPCHQRCFNVIGSFHCGCEAGYQLKGRKCID
VNECRQNVGRPDQHCKNTRGGYKCIDLCPNGMTKAENGTCIDIDECKDGT HQCRYNQICE
VNECRQNVCRPDQHCKNTRGGYKCIDLCPSGMTKAENGTCIDIDECKDGT HQCRDNQICE
NTRGSYRCVCPRGYRSQGVGRPCMDIDECENTDACQHECKNTFGSYQCICPPGYQLTHNG
NTRGSYRCACPRGYRSQGVGRPCIDIDECONRDTQCHECKNTIGSYQCVCPGYRLMLNG
KTCQDIDECLEQNVHCGPNRMCFNMRGSYQCIDTPCPPNYQRDPVSGFCLKNCPNDLEC
KTCQDVDECLEQNVRCGPNRMCFNMRGSYQCIDTPCPPNYQRDPVLGFCLKNCPNDLEC
ALSPYALEYKLVSLPFGIATNQDLIRLVAYTQDGVMPRTTFLMVDEEQVPPFALRDENL
TLSPYALEYKLVSLPFGIAANQDLIRLVAYTQDGVMPRTTFLMIDEEPVPFALRDENL
KGVVYTTTRPLREAETYRMVRASSYSANGTIEYQTTFIVYIAVSAYPY
KGVVYTTTRPLREAETYRMKGALSYSANGTIEYQTTFIVYIAVSAYPY

1/56

SEQUENCE LISTING

<110> HELIX RESEARCH INSTITUTE

<120> A novel gene encoding TSP1-like protein

<130> H1-107PCT10

<140>

<141>

<150> JP 1999-248036

<151> 1999-07-29

<150> JP 1999-300253

<151> 1999-08-27

<150> JP 2000-118776

<151> 2000-01-11

<150> JP 2000-183767

<151> 2000-05-02

<150> US 60/159,590

<151> 1999-10-18

2/56

<150> US 60/183,322

<151> 2000-02-17

<160> 50

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3414

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

aatgcgaagg gagtgatgtc cagagtgatt ttgcaacag tgacccttgc ccaacccatg 60
gtaactggag tccttggagt ggctggagaa catgcagccg gacgtgtaac ggagggcaga 120
tgcggcggta ccgcacatgt gataaccctc ctccctccaa tgggggaaga gcttgtgggg 180
gaccagactc ccagatccag aggtgcaaca ctgacatgtg tcctgtggat ggaagttggg 240
gaagctggca tagttggagc cagtgtcttg cctcctgtgg aggaggtgaa aagactcgga 300
agcggctgtg cgaccatcct gtgccagtta aaggtggccg tccctgtccc ggagacacta 360
ctcaggtgac caggtgcaat gtacaagcat gtccaggtgg gccccagcga gccagaggaa 420
gtgttatttg aaatattaat gatgttgaat ttggaattgc ttctcttaat gccacaataa 480
ctgatagccc taactcigat actagaataa tacgtgccaa aattaccaat gtacctcgta 540
gtcttggttc agcaatgaga aagatagttt ctattctaaa tccatttat tggacaacag 600
caaaggaaat aggagaagca gtcaatggct ttaccctcac caatgcagtc ttcaaaagag 660
aaactcaagt ggaatttgca actggagaaa tcttgcagat gaggcatatt gcccggggct 720
tggtattcca tggttctttg ctgctagata tcgttgtgag tggctatgtc ctacagcttc 780

3/56

agtcacctgc tgaagtcact gtaaaggatt acacagagga ctacattcaa acaggtcctg 840
ggcagctgta cgcctactca acccggtgtg tcaccattga tggcatcagc atcccataca 900
catggaacca caccgttttc tatgatcagg cacagggaag aatgcctttc ttggttgaaa 960
cacttcatgc atcctctgtg gaatctgact ataaccagat agaagagaca ctgggtttta 1020
aaattcatgc ttcaatatcc aaaggagatc gcagtaatca gtgcccctcc gggtttacct 1080
tagactcagt tggacctttt tgtgctgatg aggatgaatg tgcagcaggg aatccctgct 1140
cccatagctg ccacaatgcc atggggactt actactgctc ctgccctaaa ggcctcacca 1200
tagctgcaga tggaagaact tgtcaagata ttgatgagtg tgctttgggt aggcatacct 1260
gccacgctgg tcaggactgt gacaatacga ttggatctta tcgctgtgtg gtccgtttgtg 1320
gaagtggctt tcgaagaacc tctgatgggc tgagttgtca agatattaat gaatgtcaag 1380
aatccagccc ctgtcaccag cgctgttica atgcatagg aagtttccat tgtggatgtg 1440
aacctgggta tcagctcaaa ggcagaaaat gcatggatgt gaacgagtg agacaaaatg 1500
tatgcagacc agatcagcac tgtaagaaca cccgtgggtg ctataagtgc attgatcttt 1560
gtccaaatgg aatgaccaag gcagaaaatg gaacctgtat tgatattgat gaatgtaaag 1620
atgggaccca tcagtgcaga tataaccaga tatgtgagaa tacaagaggc agctatcggt 1680
gtgtatgccc aagaggttat cggtctcaag gagttggaag accctgcatg gatattgatg 1740
aatgtgaaaa tacagatgcc tgccagcatg agtgtaagaa tacctttgga agttatcagt 1800
gcatctgccc acctggctat caactcacac acaatggaaa gacatgcca gatatcgatg 1860
aatgtctgga gcagaatgtg cactgtggac ccaatcgcat gtgcttcaac atgagaggaa 1920
gctaccagtg catcgataca ccctgtccac ccaactacca acgggatacct gtttcagggt 1980
tctgcctcaa gaactgtcca cccaatgatt tggaatgtgc cttgagccca tatgccttgg 2040
aatacaaact cgtctccctc ccatttgga tagccaccaa tcaagattta atccggtg 2100
ttgcatacac acaggatgga gtgatgcatc ccaggacaac ttctctcatg gtagatgagg 2160
aacagactgt tccttttgcc ttgagggatg aaaacctgaa aggagtgggtg tatacaaac 2220
gaccactacg agaagcagag acctaccgca tgagggtccg agcctcatcc tacagtgcc 2280
atgggaccat tgaatatcag accacattca tagtttatat agctgtgtcc gcctatccat 2340

4/56

actaaggaac tctccaaagc ctattccaca tatttaaacc gcattaatca tggcaatcaa 2400
gccccttcc agattactgt ctcttgaaca gttgcaatct tggcagcttg aaaatgggtgc 2460
tacactctgt tttgtgtgcc ttccttggtta cttctgaggt attttcatga tcccaccatg 2520
gtcatatctt gaagtatggt ctagaaaagt cccttattat tttatttatt aacttggagc 2580
agttacttcc caaagattat tctgaacatc taacaggaca tatcagtgat ggtttacagt 2640
agtgtagtac ctaagatcat tttcctgaaa gccaaaccaa acaacgaaaa acaagaacaa 2700
ctaattcaga atcaaataga gtttttgagc atttgactat ttttagaatc ataaaattag 2760
ttactaagta ttttgatcaa agcttataaa ataacttacg gagatttttg taagtattga 2820
tacattataa taggacttgc ctattttcat ttttaagaag aaaaacacca ctcattttac 2880
aaaatatagt acagctacta taaggcttgc ttgatcccaa atgggtgctta tcttgattga 2940
acattcagaa caagatatt attttcagtg attttgtgag atcagctgaa ccacttatga 3000
taataataat aaaaaagact gctttgccct cacgtcagtt gtacatggca tggaacttta 3060
aaaattttta tataaacttt catccagtta gcttcataac ttttacgttc cagaattttg 3120
tttattttcc tgtcaatgaa agcaattttt aaagatacca gtgggacagg tttggttttt 3180
taaaaatctc atgtgttcaa attaacataa atattacacg tcaatacact gtacatgggtg 3240
gtaatagact ctaagcaatt gccaatgtgt attctatttt tatgaagtgt atatatatta 3300
ccttagtggt cattttctat ataatatctt gatggactct tttataaaat tattttataa 3360
aaaacaatgt tacactaaaa tcagcctaaa taaattttca caactttttt tcat 3414

<210> 2

<211> 1758

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

5/56

aaagcgacta tgtgacaatc cagtgccaac taaaggtggc cgttcctgtc cgggagatgc 60
caccaggtc tccagatgta acatgcaagc atgtccaggt ggacccagc gagccagagg 120
aagtgttatt ggaaatatta atgatattga gtttggatc gctttcctaa atgccacaat 180
aacagatagc cctaactg atacaagagt aatacaggcc aagattacca atgtgcctcg 240
cagtcttggc ccagcaatga gaaagatcat ttctatccta aatcccattt actggaccac 300
agcaaaggaa atagggaag cagttaatgg ctttaccctc actaacgcag tcttcaaag 360
agagacgcaa gtggaatttg caactggaga ggtcttgcgg atgacacacg tggctcgggg 420
cttagactcy gacggcgctt tgctgcttga tgtcatttg agtgccagg tcctacagct 480
ccactcacct gctgaagtcg gtgtgaagga ttacacagag gactacattc aaacaggacc 540
cggtcagctc tacgcctact caactcgtct gttcaccatc gatggcatca gtatccccta 600
tacgtggaac cataccattt tctatgatca ggcctggggg aaaatgcctt tcttagtaga 660
gacacttcat gcattctcca tagagtctga ctacaaccaa ctagaagaga cactgggttt 720
taaaatccat gttcaattt ccaaaggaga tcgcagtaac cagtgcctt ctgggttcat 780
tttagactcg gttggacctt ttgtgcaga tgaagatgaa tgcacagctg ggaaccctg 840
ctctcatacc tgccacaakg ccataggagc ctattactgc tcctgcccc aaggcctcac 900
catagctgca gatgggagaa cctgtcaaga cattgatgag tgtgctttgg gtggacatac 960
ctgtcgtgct ggtcaggact gtgacaacac cattggatcc tatcgtgtg tgggtccattg 1020
tggaacaggc ttccgaagaa cctctgatgg gtttaagctgt caagatatta atgaatgtca 1080
ggagtccagc cctgtcacc agcgatgtt caacgtcata ggaagtttcc attgtggatg 1140
tgaagctgge tatcaactca aaggcagaaa atgcatcgat gtgaatgaat gtagacagaa 1200
tgtgtgcaga ccagaccagc attgtaagaa caccgcggt ggctacaagt gcattgatct 1260
ttgtccaagt ggaatgacca aggtgaaaa tgggacctgc attgacatag atgagtgcaa 1320
agatgggacc catcagtga gatataacca aatatgtgag aacacgagag gcagctaccg 1380
gtgtgcatgc ccaaggggtt atcggtccca aggtgttga agaccctgta ttgatattga 1440
tgaatgtcaa aacagagaca cttgccaaca cgagtgtaaa aacacgatcg ggagctacca 1500
gtgcgtctgc ccaccaggtt atcgactcat gctcaatggg aaaacgtgcc aagatgtaga 1560

6/56

tgagtgcctg gagcagaatg tccgctgtgg accaaatcga atgtgtttca acatgagagg 1620
 aagctaccag tgcatygaca caycctgccc acccaactac caacgggata ctgttttggg 1680
 gttctgcctt aagaactgtc cacccaatga ctggaatgt accttaagcc catatgcctt 1740
 ggaatataaa cttgtctc 1758

<210> 3

<211> 3252

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

ggagggcaga tgaggcggtg ccgcacatgt gataatccac gtccctccaa tggaggaaga 60
 gcctgtgggg gtccagatac ccagatccag aggtgcaaca ctgacatgtg tctgtggac 120
 ggaagttggg gaacatggca cagctggagc cactgttctg tctcttggg aggaggtgaa 180
 aggactcgaa agcgactatg tgacaatcca gtgccaacta aaggtggccg ttcctgtccg 240
 ggagatgccca cccaggtctc cagatgtaac atgcaagcat gtccaggtgg accccagcga 300
 gccagaggaa gtgttattgg aaatattaat gatattgagt ttggaatcgc tttcctaaat 360
 gccacaataa cagatagccc taacactgat acaagagtaa tacaggccaa gattaccdaat 420
 gtgcctcgca gtcttggtcc agcaatgaga aagatcattt ctatcctaaa tcccatttac 480
 tggaccacag caaaggaaat aggggaagca gttaatggct ttaccctcac taacgcagtc 540
 ttcaaaagag agacgcaagt ggaatttgca actggagagg tcttgcggtat gacacacgtg 600
 gtcgggggct tagactccga cggcgccttg ctgcttgatg tcattgtgag tggccaggtc 660
 ctacagctcc actcacctgc tgaagtcggt gtgaaggatt acacagagga ctacattcaa 720
 acaggaccgg gtcagctcta tgcctactca actcgtctgt tcaccatcga tggcatcagt 780
 atccccataa cgtggaacca caccattttc tatgatcagg cctgggggaa aatgcctttc 840

ttagtagaga cacttcatgc atcttccata gactctgact acaaccaact agaagagaca 900
ctgggtttta aaatccatgc ttcaatttcc aaaggagatc gcagtaacca gtgcccctct 960
gggttcattt tagactcggg tggacccttt tgtgcagatg aagatgaatg cacagctggg 1020
aacccttgct ctcatacctg ccacaatgcc ataggagcct attactgctc ctgccccaaa 1080
ggcctcacca tagctgcaga tgggagaacc tgtcaagaca ttgatgagtg tgctttgggt 1140
ggacatacct gtcgtgctgg tcaggactgt gacaacacca ttggatccta tcgctgtgtg 1200
gtccattgtg gaacaggctt ccgaagaacc tctgatgggt taagctgtca agatattaat 1260
gaatgtcagg agtccagccc ctgtcaccag cgatgtttca acgtcatagg aagtttccat 1320
tgtggatgtg aagctggcta tcaactcaaa ggcagaaaat gcatcgatgt gaatgaatgt 1380
agacagaatg tgtgcagacc agaccagcat tgtaagaaca cccgcgggtg ctacaagtgc 1440
attgatcttt gtccaagtgg aatgaccaag gctgaaaatg ggacctgcat tgacatagat 1500
gagtgc aaag atgggaccca tcagtgcaga gataacaaa tatgtgagaa cacgagaggc 1560
agctaccggt gtgcatgccc aaggggttat cgggtccaag gtgttggaag accctgtatt 1620
gatattgatg aatgtcaaaa cagagacact tgccaacacg agtgtaaaaa cacgatcggg 1680
agctaccagt gcgtctgccc accaggttat cgactcatgc tcaatgggaa aacgtgcaa 1740
gatgtagatg agtgccctgga gcagaatgtc cgctgtggac caaatcgaat gtgtttcaac 1800
atgagaggaa gctaccagtg catcgacaca cctgcccac ccaactacca acgggatcct 1860
gttttggggt tctgccttaa gaactgtcca ccaatgact tggaatgtac cttaagccca 1920
tatgccttgg aatataaact tgtctccctc ccatttggaa tagccgcaa tcaagattta 1980
atccggctgg ttgcatacac acaggatggc gtgatgcac ccaggacaac tttcctcatg 2040
atagatgagg aaccagctgt ccttttggc ttaagggatg aaaacctgaa aggagttgtg 2100
tacactacac gtccactacg agaggcagag acctaccgca tgaagggtgg agctttatcc 2160
tacagtgcc aatgggacat tgagtatcag actacattca tagtttatat agctgtgtct 2220
gcctatccgt actaggaagc actccagaat caagtccaaa tatttaagct gcattgatct 2280
agccatcgag gacctctaca gtttactatc tcttgaacag ttgcaatctt ggcaacttga 2340
aatgggtgct gtactctgtt acgtatgttc cttgggtactg ctgaagtatc tgtatgatcc 2400

8/56

cactatggtc gtgtatcttt tagtaagttc tagaagcgtc ctttgttatt ttctttatctt 2460
 attacactgg agcagttact tcccaaggat tattcigatc agctcacagg acatgtcagt 2520
 gacattgtat agtagcatag tagctaagat cgttttcttg gaaacaatat aaaacaaaac 2580
 aaaacagaac tagttcaaac actttttgaa cattctggct attcttataaa tggtaaaacc 2640
 agttactatg tgatttgata aacgcttatg ccataataat acatttttaa aatattgata 2700
 taacacttat acatctttca ttttaagggt aaaaaagaaa caacactttt ctgaaatata 2760
 gtgcagatac aagaaagttt gtttgatcct aaacaaactt atctttatta aatactcaag 2820
 gtcttattaa attccctgag gttctgtgaa atcttacct atgggtatcag aaagtgcatt 2880
 tccctttaga tagttgcca tggcctgggt ctgacattt tggataaacc atttattcac 2940
 tcaactcctt aacttttaca ttccatattt ttctgtcaaa tgaaattatt ttaagacata 3000
 gcaatagaac aaatttcttg attattgtaa tcatgtatgt tcaagttaac gtgttaaacc 3060
 tcaatacact gtacatggg gtaacagact ctgtaagcaa ttgtcaagat gtattctatt 3120
 tttatgaagt gtatatatta ccttagtggt tattttctat attatatctt gatggactct 3180
 tttataaaat tattttataa aaaaaatatt acagtaaaat aaacctaaat aaaatgttcc 3240
 accttttttc tt 3252

<210> 4

<211> 4224

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 4

gtagatgctg gtggcagagt catactggat tgccaagcag ctgggaacc gcagccaacc 60
 atcacatggt cccgccaagg gcaacccatc tcctgggata aycgactttc catgctgcct 120
 aacagctcat tatacatcgc tgctgctcgt aaggaagata cttctgaata tgaatgcgtt 180

9/56

gcccgaaact tgatgggctc tgcctggtc agagtgcctg tcatagtcca ggtgcacggt 240
gggttttcat tgtggtctgc ctggaggccc tgcagtgtca cctgtggaaa aggcattcaa 300
aagaggagcc ggctgtgcga caaccacact ccagccaatg gagggaggcc atgccaaggg 360
gcggattcag aagcgcgaca ctgtcacaat aagctgtgtc cagtggatgg tcaactggtca 420
gaatggagtt tctgggaaga ctgtcaaga agctgtgggc atggcaacca aactaggacg 480
agaacttgca gcaaccgcc ggctcagcat ggcgggcggc catgcgaggg gcatgctgtg 540
gaaaccatta tgtgtaacat caggccttgc ccagtccatg gtgtgtggaa tgcttggcag 600
ccttggagtg cgtgcagcaa aagctgtgga aaaggcagtc agaccagaat gagactttgc 660
aacaaccgc caccgtcatt tgggtggggc cactgcagtg gagcagaaac ccagatgcaa 720
gtctgcaatg agagacactg tccagtggat ggaggtggg cgacttggag cagtggagt 780
gcctgcaccg tatctgcgg aggaggtgcc aggaagagaa caagggactg ttctgacca 840
gtgccacagt atggaggaaa caaatgtgaa gggactgtg tccagagtga cttttgcaat 900
agtgaccctt gtccaacca tggtaactgg agcccttga gcggctgggg gacgtgcagt 960
cggacatgca atggagggca gatgaggcgg taccgcacat gtgataatcc acgtccctcc 1020
aatggaggaa gagcctgtgg gggccagat acccagatcc agaggtgcaa cactgacatg 1080
tgtcctgtgg acggaagttg gggaacatgg cacagtggg gccactgttc tgtctcttgt 1140
ggaggagggtg aaaggactcg aaagcgacta tgtgacaatc cagtgccaac taaagggtggc 1200
cgttcctgtc cgggagatgc caccaggtc tccagatgta acatgcaagc atgtccaggt 1260
ggaccccagc gagccagagg aagtgttatt ggaaatatta atgatattga gtttggaaac 1320
gctttcctaa atgccacaat aacagatagc cctaacactg atacaagagt aatacaggcc 1380
aagattacca atgtgcctcg cagtcttggc ccagcaatga gaaagatcat ttctatccta 1440
aatcccattt actggaccac agcaaaggaa ataggggaag cagttaatgg ctttaccctc 1500
actaacgcag tcttcaaaaag agagacgcaa gtggaatttg caactggaga ggtcttgagg 1560
atgacacacg tggctcgggg cttagactcc gacggcgcc tgcgtgtga tgcattgtg 1620
agtggccagg tcctacagct ccactcacct gctgaagtc gtgtgaagga ttacacagag 1680
gactacattc aaacaggacc cggtcagctc tatgcctact caactcgtct gttcaccatc 1740

10/56

gatggcatca gtatccccta tacgtggaac cacaccattt tctatgatca ggcctggggg 1800
aaaatgcctt tcttagtaga gacattcat gcatttcca tagagtctga ctacaaccaa 1860
ctagaagaga cactgggttt taaaatccat gcttcaattt ccaaaggaga tcgcagtaac 1920
cagtgccctt ctgggttcat tttagactcg gttggaccct tttgtgcaga tgaagatgaa 1980
tgcacagctg ggaacccctg ctctcatacc tgccacaatg ccataggagc ctattactgc 2040
tcctgcccc aaggcctcac catagctgca gatgggagaa cctgtcaaga cattgatgag 2100
tgtgctttgg gtggacatac ctgtcgtgct ggtcaggact gtgacaacac cattggatcc 2160
tatcgctgtg tgggccattg tggaacaggc ttccgaagaa cctctgatgg gttaagctgt 2220
caagatatta atgaatgtca ggagtccagc ccctgtcacc agcgatgttt caacgtcata 2280
ggaagtttcc attgtggatg tgaagctggc tatcaactca aaggcagaaa atgcatcgat 2340
gtgaatgaat gtagacagaa tgtgtgcaga ccagaccagc attgtaagaa caccgcggt 2400
ggctacaagt gcattgatct ttgtccaagt ggaatgacca aggctgaaaa tgggacctgc 2460
attgacatag atgagtgcaa agatgggacc catcagtgca gagataacca aatatgtgag 2520
aacacgagag gcagctaccg gtgtgcatgc ccaaggggtt atcggtccca aggtgttga 2580
agaccctgta ttgatattga tgaatgtcaa aacagagaca cttgccaaca cgagtgtaaa 2640
aacacgatcg ggagctacca gtgcgtctgc ccaccagggt atcgactcat gctcaatggg 2700
aaaacgtgcc aagatgtaga tgagtgcctg gagcagaatg tccgctgtgg accaaatcga 2760
atgtgtttca acatgagagg aagctaccag tgcacgaca caccctgcc acccaactac 2820
caacgggatc ctgttttggg gttctgcctt aagaactgtc cacccaatga cttggaatgt 2880
accttaagcc catatgcctt ggaatataaa cttgtctccc tcccatttgg aatagccgcc 2940
aatcaagatt taatccggtt ggttgcatc acacaggatg gcgtgatgca tcccaggaca 3000
actttcctca tgatagatga ggaaccagct gtcccttttg ccttaaggga tgaaaacctg 3060
aaaggagtig tgtacactac acgtccacta cgagaggcag agacctaccg catgaagggtg 3120
ggagctttat cctacagtgc caatgggacc attgagtatc agactacatt catagtttat 3180
atagctgtgt ctgcctatcc gtactaggaa gcactccaga atcaagtcca aatatttaag 3240
ctgcattgat ctagccatcg aggacctcta cagtttacta tctcttgaac agttgcaatc 3300

11/56

ttggcaactt gaaaatgggtg ctgtactctg ttacgtatgt tccttggtag tgctgaagta 3360
 tctgtatgat ccactatgg tcgtgtatct tttagtaagt tctagaagcg tcctttgtta 3420
 ttttctttat ttattacact ggagcagtta ctcccaagg attattctga tcagctcaca 3480
 ggacatgtca gtgacattgt atagtagcat agtagctaag atcgttttct tggaaacaat 3540
 ataaaacaaa acaaaacaga actagttcaa acactttttg aacattctgg ctattcttaa 3600
 aatggtaaaa ccagttacta tgtgatttga taaacgttta tgccataata atacattttt 3660
 aaaatattga tataacactt atacatcttt cattttaagg ttaaaaaaga aacaacactt 3720
 ttctgaaata cagtcagat acaagaaagt ttgtttgatc ctaaacaac ttatctttat 3780
 taaatactca aggttctatt aaattccctg aggttctgtg aaatcttaca ctatgggtatc 3840
 agaaagtgc tttcccttta gatagttgcc catggcctgg gtcttgacat ttggtataa 3900
 ccatttattc actcaactcc ttaactttta cattccatat tttctgtca aatgaaatta 3960
 ttttaagaca tagcaataga acaaatttct tgattattgt aatcatgtat gttcaagtta 4020
 acgtgttaaa cgtcaataca ctgtacatgg tggtaacaga ctctgtaagc aattgtcaag 4080
 atgtattcta tttttatgaa gtgtatatat taccttagtg tgtattttct atattatc 4140
 ttgatggact cttttataaa attattttat aaaaaaata ttacagtaaa ataaacctaa 4200
 ataaaatggt ccaccttttt tctt 4224

<210> 5

<211> 780

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Cys Glu Gly Ser Asp Val Gln Ser Asp Phe Cys Asn Ser Asp Pro Cys

1

5

10

15

12/56

Pro Thr His Gly Asn Trp Ser Pro Trp Ser Gly Trp Arg Thr Cys Ser

20

25

30

Arg Thr Cys Asn Gly Gly Gln Met Arg Arg Tyr Arg Thr Cys Asp Asn

35

40

45

Pro Pro Pro Ser Asn Gly Gly Arg Ala Cys Gly Gly Pro Asp Ser Gln

50

55

60

Ile Gln Arg Cys Asn Thr Asp Met Cys Pro Val Asp Gly Ser Trp Gly

65

70

75

80

Ser Trp His Ser Trp Ser Gln Cys Ser Ala Ser Cys Gly Gly Gly Glu

85

90

95

Lys Thr Arg Lys Arg Leu Cys Asp His Pro Val Pro Val Lys Gly Gly

100

105

110

Arg Pro Cys Pro Gly Asp Thr Thr Gln Val Thr Arg Cys Asn Val Gln

115

120

125

Ala Cys Pro Gly Gly Pro Gln Arg Ala Arg Gly Ser Val Ile Gly Asn

130

135

140

Ile Asn Asp Val Glu Phe Gly Ile Ala Phe Leu Asn Ala Thr Ile Thr

13/56

145

150

155

160

Asp Ser Pro Asn Ser Asp Thr Arg Ile Ile Arg Ala Lys Ile Thr Asn

165

170

175

Val Pro Arg Ser Leu Gly Ser Ala Met Arg Lys Ile Val Ser Ile Leu

180

185

190

Asn Pro Ile Tyr Trp Thr Thr Ala Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Asn

195

200

205

Gly Phe Thr Leu Thr Asn Ala Val Phe Lys Arg Glu Thr Gln Val Glu

210

215

220

Phe Ala Thr Gly Glu Ile Leu Gln Met Ser His Ile Ala Arg Gly Leu

225

230

235

240

Asp Ser Asp Gly Ser Leu Leu Leu Asp Ile Val Val Ser Gly Tyr Val

245

250

255

Leu Gln Leu Gln Ser Pro Ala Glu Val Thr Val Lys Asp Tyr Thr Glu

260

265

270

Asp Tyr Ile Gln Thr Gly Pro Gly Gln Leu Tyr Ala Tyr Ser Thr Arg

275

280

285

14/56

Leu Phe Thr Ile Asp Gly Ile Ser Ile Pro Tyr Thr Trp Asn His Thr

290

295

300

Val Phe Tyr Asp Gln Ala Gln Gly Arg Met Pro Phe Leu Val Glu Thr

305

310

315

320

Leu His Ala Ser Ser Val Glu Ser Asp Tyr Asn Gln Ile Glu Glu Thr

325

330

335

Leu Gly Phe Lys Ile His Ala Ser Ile Ser Lys Gly Asp Arg Ser Asn

340

345

350

Gln Cys Pro Ser Gly Phe Thr Leu Asp Ser Val Gly Pro Phe Cys Ala

355

360

365

Asp Glu Asp Glu Cys Ala Ala Gly Asn Pro Cys Ser His Ser Cys His

370

375

380

Asn Ala Met Gly Thr Tyr Tyr Cys Ser Cys Pro Lys Gly Leu Thr Ile

385

390

395

400

Ala Ala Asp Gly Arg Thr Cys Gln Asp Ile Asp Glu Cys Ala Leu Gly

405

410

415

Arg His Thr Cys His Ala Gly Gln Asp Cys Asp Asn Thr Ile Gly Ser

420

425

430

15/56

Tyr Arg Cys Val Val Arg Cys Gly Ser Gly Phe Arg Arg Thr Ser Asp

435

440

445

Gly Leu Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Gln Glu Ser Ser Pro Cys

450

455

460

His Gln Arg Cys Phe Asn Ala Ile Gly Ser Phe His Cys Gly Cys Glu

465

470

475

480

Pro Gly Tyr Gln Leu Lys Gly Arg Lys Cys Met Asp Val Asn Glu Cys

485

490

495

Arg Gln Asn Val Cys Arg Pro Asp Gln His Cys Lys Asn Thr Arg Gly

500

505

510

Gly Tyr Lys Cys Ile Asp Leu Cys Pro Asn Gly Met Thr Lys Ala Glu

515

520

525

Asn Gly Thr Cys Ile Asp Ile Asp Glu Cys Lys Asp Gly Thr His Gln

530

535

540

Cys Arg Tyr Asn Gln Ile Cys Glu Asn Thr Arg Gly Ser Tyr Arg Cys

545

550

555

560

Val Cys Pro Arg Gly Tyr Arg Ser Gln Gly Val Gly Arg Pro Cys Met

16/56

565

570

575

Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Thr Asp Ala Cys Gln His Glu Cys Lys

580

585

590

Asn Thr Phe Gly Ser Tyr Gln Cys Ile Cys Pro Pro Gly Tyr Gln Leu

595

600

605

Thr His Asn Gly Lys Thr Cys Gln Asp Ile Asp Glu Cys Leu Glu Gln

610

615

620

Asn Val His Cys Gly Pro Asn Arg Met Cys Phe Asn Met Arg Gly Ser

625

630

635

640

Tyr Gln Cys Ile Asp Thr Pro Cys Pro Pro Asn Tyr Gln Arg Asp Pro

645

650

655

Val Ser Gly Phe Cys Leu Lys Asn Cys Pro Pro Asn Asp Leu Glu Cys

660

665

670

Ala Leu Ser Pro Tyr Ala Leu Glu Tyr Lys Leu Val Ser Leu Pro Phe

675

680

685

Gly Ile Ala Thr Asn Gln Asp Leu Ile Arg Leu Val Ala Tyr Thr Gln

690

695

700

17/56

Asp Gly Val Met His Pro Arg Thr Thr Phe Leu Met Val Asp Glu Glu

705

710

715

720

Gln Thr Val Pro Phe Ala Leu Arg Asp Glu Asn Leu Lys Gly Val Val

725

730

735

Tyr Thr Thr Arg Pro Leu Arg Glu Ala Glu Thr Tyr Arg Met Arg Val

740

745

750

Arg Ala Ser Ser Tyr Ser Ala Asn Gly Thr Ile Glu Tyr Gln Thr Thr

755

760

765

Phe Ile Val Tyr Ile Ala Val Ser Ala Tyr Pro Tyr

770

775

780

<210> 6

<211> 585

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Lys Arg Leu Cys Asp Asn Pro Val Pro Thr Lys Gly Gly Arg Ser Cys

1

5

10

15

Pro Gly Asp Ala Thr Gln Val Ser Arg Cys Asn Met Gln Ala Cys Pro

18/56

20

25

30

Gly Gly Pro Gln Arg Ala Arg Gly Ser Val Ile Gly Asn Ile Asn Asp

35

40

45

Ile Glu Phe Gly Ile Ala Phe Leu Asn Ala Thr Ile Thr Asp Ser Pro

50

55

60

Asn Thr Asp Thr Arg Val Ile Gln Ala Lys Ile Thr Asn Val Pro Arg

65

70

75

80

Ser Leu Gly Pro Ala Met Arg Lys Ile Ile Ser Ile Leu Asn Pro Ile

85

90

95

Tyr Trp Thr Thr Ala Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Asn Gly Phe Thr

100

105

110

Leu Thr Asn Ala Val Phe Lys Arg Glu Thr Gln Val Glu Phe Ala Thr

115

120

125

Gly Glu Val Leu Arg Met Thr His Val Ala Arg Gly Leu Asp Ser Asp

130

135

140

Gly Ala Leu Leu Leu Asp Val Ile Val Ser Gly Gln Val Leu Gln Leu

145

150

155

160

19/56

His Ser Pro Ala Glu Val Gly Val Lys Asp Tyr Thr Glu Asp Tyr Ile

165

170

175

Gln Thr Gly Pro Gly Gln Leu Tyr Ala Tyr Ser Thr Arg Leu Phe Thr

180

185

190

Ile Asp Gly Ile Ser Ile Pro Tyr Thr Trp Asn His Thr Ile Phe Tyr

195

200

205

Asp Gln Ala Trp Gly Lys Met Pro Phe Leu Val Glu Thr Leu His Ala

210

215

220

Ser Ser Ile Glu Ser Asp Tyr Asn Gln Leu Glu Glu Thr Leu Gly Phe

225

230

235

240

Lys Ile His Ala Ser Ile Ser Lys Gly Asp Arg Ser Asn Gln Cys Pro

245

250

255

Ser Gly Phe Ile Leu Asp Ser Val Gly Pro Phe Cys Ala Asp Glu Asp

260

265

270

Glu Cys Thr Ala Gly Asn Pro Cys Ser His Thr Cys His Xaa Ala Ile

275

280

285

Gly Ala Tyr Tyr Cys Ser Cys Pro Lys Gly Leu Thr Ile Ala Ala Asp

290

295

300

20/56

Gly Arg Thr Cys Gln Asp Ile Asp Glu Cys Ala Leu Gly Gly His Thr

305 310 315 320

Cys Arg Ala Gly Gln Asp Cys Asp Asn Thr Ile Gly Ser Tyr Arg Cys

325 330 335

Val Val His Cys Gly Thr Gly Phe Arg Arg Thr Ser Asp Gly Leu Ser

340 345 350

Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Gln Glu Ser Ser Pro Cys His Gln Arg

355 360 365

Cys Phe Asn Val Ile Gly Ser Phe His Cys Gly Cys Glu Ala Gly Tyr

370 375 380

Gln Leu Lys Gly Arg Lys Cys Ile Asp Val Asn Glu Cys Arg Gln Asn

385 390 395 400

Val Cys Arg Pro Asp Gln His Cys Lys Asn Thr Arg Gly Gly Tyr Lys

405 410 415

Cys Ile Asp Leu Cys Pro Ser Gly Met Thr Lys Ala Glu Asn Gly Thr

420 425 430

Cys Ile Asp Ile Asp Glu Cys Lys Asp Gly Thr His Gln Cys Arg Tyr

21/56

435

440

445

Asn Gln Ile Cys Glu Asn Thr Arg Gly Ser Tyr Arg Cys Ala Cys Pro

450

455

460

Arg Gly Tyr Arg Ser Gln Gly Val Gly Arg Pro Cys Ile Asp Ile Asp

465

470

475

480

Glu Cys Gln Asn Arg Asp Thr Cys Gln His Glu Cys Lys Asn Thr Ile

485

490

495

Gly Ser Tyr Gln Cys Val Cys Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Met Leu Asn

500

505

510

Gly Lys Thr Cys Gln Asp Val Asp Glu Cys Leu Glu Gln Asn Val Arg

515

520

525

Cys Gly Pro Asn Arg Met Cys Phe Asn Met Arg Gly Ser Tyr Gln Cys

530

535

540

Ile Asp Thr Ser Cys Pro Pro Asn Tyr Gln Arg Asp Pro Val Leu Gly

545

550

555

560

Phe Cys Leu Lys Asn Cys Pro Pro Asn Asp Leu Glu Cys Thr Leu Ser

565

570

575

22/56

Pro Tyr Ala Leu Glu Tyr Lys Leu Val

580

585

<210> 7

<211> 744

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Gly Gly Gln Met Arg Arg Tyr Arg Thr Cys Asp Asn Pro Arg Pro Ser

1

5

10

15

Asn Gly Gly Arg Ala Cys Gly Gly Pro Asp Thr Gln Ile Gln Arg Cys

20

25

30

Asn Thr Asp Met Cys Pro Val Asp Gly Ser Trp Gly Thr Trp His Ser

35

40

45

Trp Ser His Cys Ser Val Ser Cys Gly Gly Gly Glu Arg Thr Arg Lys

50

55

60

Arg Leu Cys Asp Asn Pro Val Pro Thr Lys Gly Gly Arg Ser Cys Pro

65

70

75

80

Gly Asp Ala Thr Gln Val Ser Arg Cys Asn Met Gln Ala Cys Pro Gly

23/56

85

90

95

Gly Pro Gln Arg Ala Arg Gly Ser Val Ile Gly Asn Ile Asn Asp Ile

100

105

110

Glu Phe Gly Ile Ala Phe Leu Asn Ala Thr Ile Thr Asp Ser Pro Asn

115

120

125

Thr Asp Thr Arg Val Ile Gln Ala Lys Ile Thr Asn Val Pro Arg Ser

130

135

140

Leu Gly Pro Ala Met Arg Lys Ile Ile Ser Ile Leu Asn Pro Ile Tyr

145

150

155

160

Trp Thr Thr Ala Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Asn Gly Phe Thr Leu

165

170

175

Thr Asn Ala Val Phe Lys Arg Glu Thr Gln Val Glu Phe Ala Thr Gly

180

185

190

Glu Val Leu Arg Met Thr His Val Ala Arg Gly Leu Asp Ser Asp Gly

195

200

205

Ala Leu Leu Leu Asp Val Ile Val Ser Gly Gln Val Leu Gln Leu His

210

215

220

24/56

Ser Pro Ala Glu Val Gly Val Lys Asp Tyr Thr Glu Asp Tyr Ile Gln

225

230

235

240

Thr Gly Pro Gly Gln Leu Tyr Ala Tyr Ser Thr Arg Leu Phe Thr Ile

245

250

255

Asp Gly Ile Ser Ile Pro Tyr Thr Trp Asn His Thr Ile Phe Tyr Asp

260

265

270

Gln Ala Trp Gly Lys Met Pro Phe Leu Val Glu Thr Leu His Ala Ser

275

280

285

Ser Ile Glu Ser Asp Tyr Asn Gln Leu Glu Glu Thr Leu Gly Phe Lys

290

295

300

Ile His Ala Ser Ile Ser Lys Gly Asp Arg Ser Asn Gln Cys Pro Ser

305

310

315

320

Gly Phe Ile Leu Asp Ser Val Gly Pro Phe Cys Ala Asp Glu Asp Glu

325

330

335

Cys Thr Ala Gly Asn Pro Cys Ser His Thr Cys His Asn Ala Ile Gly

340

345

350

Ala Tyr Tyr Cys Ser Cys Pro Lys Gly Leu Thr Ile Ala Ala Asp Gly

355

360

365

25/56

Arg Thr Cys Gln Asp Ile Asp Glu Cys Ala Leu Gly Gly His Thr Cys

370

375

380

Arg Ala Gly Gln Asp Cys Asp Asn Thr Ile Gly Ser Tyr Arg Cys Val

385

390

395

400

Val His Cys Gly Thr Gly Phe Arg Arg Thr Ser Asp Gly Leu Ser Cys

405

410

415

Gln Asp Ile Asn Glu Cys Gln Glu Ser Ser Pro Cys His Gln Arg Cys

420

425

430

Phe Asn Val Ile Gly Ser Phe His Cys Gly Cys Glu Ala Gly Tyr Gln

435

440

445

Leu Lys Gly Arg Lys Cys Ile Asp Val Asn Glu Cys Arg Gln Asn Val

450

455

460

Cys Arg Pro Asp Gln His Cys Lys Asn Thr Arg Gly Gly Tyr Lys Cys

465

470

475

480

Ile Asp Leu Cys Pro Ser Gly Met Thr Lys Ala Glu Asn Gly Thr Cys

485

490

495

Ile Asp Ile Asp Glu Cys Lys Asp Gly Thr His Gln Cys Arg Asp Asn

26/56

500	505	510
Gln Ile Cys Glu Asn Thr Arg Gly Ser Tyr Arg Cys Ala Cys Pro Arg		
515	520	525
Gly Tyr Arg Ser Gln Gly Val Gly Arg Pro Cys Ile Asp Ile Asp Glu		
530	535	540
Cys Gln Asn Arg Asp Thr Cys Gln His Glu Cys Lys Asn Thr Ile Gly		
545	550	555
Ser Tyr Gln Cys Val Cys Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Met Leu Asn Gly		
565	570	575
Lys Thr Cys Gln Asp Val Asp Glu Cys Leu Glu Gln Asn Val Arg Cys		
580	585	590
Gly Pro Asn Arg Met Cys Phe Asn Met Arg Gly Ser Tyr Gln Cys Ile		
595	600	605
Asp Thr Pro Cys Pro Pro Asn Tyr Gln Arg Asp Pro Val Leu Gly Phe		
610	615	620
Cys Leu Lys Asn Cys Pro Pro Asn Asp Leu Glu Cys Thr Leu Ser Pro		
625	630	635
640		

27/56

Tyr Ala Leu Glu Tyr Lys Leu Val Ser Leu Pro Phe Gly Ile Ala Ala

645

650

655

Asn Gln Asp Leu Ile Arg Leu Val Ala Tyr Thr Gln Asp Gly Val Met

660

665

670

His Pro Arg Thr Thr Phe Leu Met Ile Asp Glu Glu Pro Ala Val Pro

675

680

685

Phe Ala Leu Arg Asp Glu Asn Leu Lys Gly Val Val Tyr Thr Thr Arg

690

695

700

Pro Leu Arg Glu Ala Glu Thr Tyr Arg Met Lys Val Gly Ala Leu Ser

705

710

715

720

Tyr Ser Ala Asn Gly Thr Ile Glu Tyr Gln Thr Thr Phe Ile Val Tyr

725

730

735

Ile Ala Val Ser Ala Tyr Pro Tyr

740

<210> 8

<211> 1068

<212> PRT

<213> Mus musculus

28/56

<400> 8

Val Asp Ala Gly Gly Arg Val Ile Leu Asp Cys Gln Ala Ala Gly Glu

1 5 10 15

Pro Gln Pro Thr Ile Thr Trp Ser Arg Gln Gly Gln Pro Ile Ser Trp

20 25 30

Asp Asn Arg Leu Ser Met Leu Pro Asn Ser Ser Leu Tyr Ile Ala Ala

35 40 45

Ala Arg Lys Glu Asp Thr Ser Glu Tyr Glu Cys Val Ala Arg Asn Leu

50 55 60

Met Gly Ser Val Leu Val Arg Val Pro Val Ile Val Gln Val His Gly

65 70 75 80

Gly Phe Ser Leu Trp Ser Ala Trp Arg Pro Cys Ser Val Thr Cys Gly

85 90 95

Lys Gly Ile Gln Lys Arg Ser Arg Leu Cys Asp Asn Pro Pro Pro Ala

100 105 110

Asn Gly Gly Arg Pro Cys Gln Gly Ala Asp Ser Glu Ala Arg His Cys

115 120 125

29/56

His Asn Lys Leu Cys Pro Val Asp Gly His Trp Ser Glu Trp Ser Phe

130

135

140

Trp Glu Asp Cys Ser Arg Ser Cys Gly His Gly Asn Gln Thr Arg Thr

145

150

155

160

Arg Thr Cys Ser Asn Pro Pro Ala Gln His Gly Gly Arg Pro Cys Glu

165

170

175

Gly His Ala Val Glu Thr Ile Met Cys Asn Ile Arg Pro Cys Pro Val

180

185

190

His Gly Val Trp Asn Ala Trp Gln Pro Trp Ser Ala Cys Ser Lys Ser

195

200

205

Cys Gly Lys Gly Ser Gln Thr Arg Met Arg Leu Cys Asn Asn Pro Pro

210

215

220

Pro Ser Phe Gly Gly Ala His Cys Ser Gly Ala Glu Thr Gln Met Gln

225

230

235

240

Val Cys Asn Glu Arg His Cys Pro Val Asp Gly Arg Trp Ala Thr Trp

245

250

255

Ser Ser Trp Ser Ala Cys Thr Val Ser Cys Gly Gly Gly Ala Arg Lys

260

265

270

30/56

Arg Thr Arg Asp Cys Ser Asp Pro Val Pro Gln Tyr Gly Gly Asn Lys

275

280

285

Cys Glu Gly Thr Gly Val Gln Ser Asp Phe Cys Asn Ser Asp Pro Cys

290

295

300

Pro Thr His Gly Asn Trp Ser Pro Trp Ser Gly Trp Gly Thr Cys Ser

305

310

315

320

Arg Thr Cys Asn Gly Gly Gln Met Arg Arg Tyr Arg Thr Cys Asp Asn

325

330

335

Pro Arg Pro Ser Asn Gly Gly Arg Ala Cys Gly Gly Pro Asp Thr Gln

340

345

350

Ile Gln Arg Cys Asn Thr Asp Met Cys Pro Val Asp Gly Ser Trp Gly

355

360

365

Thr Trp His Ser Trp Ser His Cys Ser Val Ser Cys Gly Gly Gly Glu

370

375

380

Arg Thr Arg Lys Arg Leu Cys Asp Asn Pro Val Pro Thr Lys Gly Gly

385

390

395

400

Arg Ser Cys Pro Gly Asp Ala Thr Gln Val Ser Arg Cys Asn Met Gln

31/56

405

410

415

Ala Cys Pro Gly Gly Pro Gln Arg Ala Arg Gly Ser Val Ile Gly Asn

420

425

430

Ile Asn Asp Ile Glu Phe Gly Ile Ala Phe Leu Asn Ala Thr Ile Thr

435

440

445

Asp Ser Pro Asn Thr Asp Thr Arg Val Ile Gln Ala Lys Ile Thr Asn

450

455

460

Val Pro Arg Ser Leu Gly Pro Ala Met Arg Lys Ile Ile Ser Ile Leu

465

470

475

480

Asn Pro Ile Tyr Trp Thr Thr Ala Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Asn

485

490

495

Gly Phe Thr Leu Thr Asn Ala Val Phe Lys Arg Glu Thr Gln Val Glu

500

505

510

Phe Ala Thr Gly Glu Val Leu Arg Met Thr His Val Ala Arg Gly Leu

515

520

525

Asp Ser Asp Gly Ala Leu Leu Leu Asp Val Ile Val Ser Gly Gln Val

530

535

540

32/56

Leu Gln Leu His Ser Pro Ala Glu Val Gly Val Lys Asp Tyr Thr Glu

545

550

555

560

Asp Tyr Ile Gln Thr Gly Pro Gly Gln Leu Tyr Ala Tyr Ser Thr Arg

565

570

575

Leu Phe Thr Ile Asp Gly Ile Ser Ile Pro Tyr Thr Trp Asn His Thr

580

585

590

Ile Phe Tyr Asp Gln Ala Trp Gly Lys Met Pro Phe Leu Val Glu Thr

595

600

605

Leu His Ala Ser Ser Ile Glu Ser Asp Tyr Asn Gln Leu Glu Glu Thr

610

615

620

Leu Gly Phe Lys Ile His Ala Ser Ile Ser Lys Gly Asp Arg Ser Asn

625

630

635

640

Gln Cys Pro Ser Gly Phe Ile Leu Asp Ser Val Gly Pro Phe Cys Ala

645

650

655

Asp Glu Asp Glu Cys Thr Ala Gly Asn Pro Cys Ser His Thr Cys His

660

665

670

Asn Ala Ile Gly Ala Tyr Tyr Cys Ser Cys Pro Lys Gly Leu Thr Ile

675

680

685

33/56

Ala Ala Asp Gly Arg Thr Cys Gln Asp Ile Asp Glu Cys Ala Leu Gly

690

695

700

Gly His Thr Cys Arg Ala Gly Gln Asp Cys Asp Asn Thr Ile Gly Ser

705

710

715

720

Tyr Arg Cys Val Val His Cys Gly Thr Gly Phe Arg Arg Thr Ser Asp

725

730

735

Gly Leu Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Gln Glu Ser Ser Pro Cys

740

745

750

His Gln Arg Cys Phe Asn Val Ile Gly Ser Phe His Cys Gly Cys Glu

755

760

765

Ala Gly Tyr Gln Leu Lys Gly Arg Lys Cys Ile Asp Val Asn Glu Cys

770

775

780

Arg Gln Asn Val Cys Arg Pro Asp Gln His Cys Lys Asn Thr Arg Gly

785

790

795

800

Gly Tyr Lys Cys Ile Asp Leu Cys Pro Ser Gly Met Thr Lys Ala Glu

805

810

815

Asn Gly Thr Cys Ile Asp Ile Asp Glu Cys Lys Asp Gly Thr His Gln

34/56

820

825

830

Cys Arg Asp Asn Gln Ile Cys Glu Asn Thr Arg Gly Ser Tyr Arg Cys

835

840

845

Ala Cys Pro Arg Gly Tyr Arg Ser Gln Gly Val Gly Arg Pro Cys Ile

850

855

860

Asp Ile Asp Glu Cys Gln Asn Arg Asp Thr Cys Gln His Glu Cys Lys

865

870

875

880

Asn Thr Ile Gly Ser Tyr Gln Cys Val Cys Pro Pro Gly Tyr Arg Leu

885

890

895

Met Leu Asn Gly Lys Thr Cys Gln Asp Val Asp Glu Cys Leu Glu Gln

900

905

910

Asn Val Arg Cys Gly Pro Asn Arg Met Cys Phe Asn Met Arg Gly Ser

915

920

925

Tyr Gln Cys Ile Asp Thr Pro Cys Pro Pro Asn Tyr Gln Arg Asp Pro

930

935

940

Val Leu Gly Phe Cys Leu Lys Asn Cys Pro Pro Asn Asp Leu Glu Cys

945

950

955

960

35/56

Thr Leu Ser Pro Tyr Ala Leu Glu Tyr Lys Leu Val Ser Leu Pro Phe

965

970

975

Gly Ile Ala Ala Asn Gln Asp Leu Ile Arg Leu Val Ala Tyr Thr Gln

980

985

990

Asp Gly Val Met His Pro Arg Thr Thr Phe Leu Met Ile Asp Glu Glu

995

1000

1005

Pro Ala Val Pro Phe Ala Leu Arg Asp Glu Asn Leu Lys Gly Val Val

1010

1015

1020

Tyr Thr Thr Arg Pro Leu Arg Glu Ala Glu Thr Tyr Arg Met Lys Val

1025

1030

1035

1040

Gly Ala Leu Ser Tyr Ser Ala Asn Gly Thr Ile Glu Tyr Gln Thr Thr

1045

1050

1055

Phe Ile Val Tyr Ile Ala Val Ser Ala Tyr Pro Tyr

1060

1065

<210> 9

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

36/56

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially
synthesized Oligo-cap linker sequence

<400> 9

agcaucgagu cggccuuguu ggccuacugg

30

<210> 10

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized Oligo-dT primer sequence

<400> 10

gcggctgaag acggcctatg tggccttttt tttttttttt tt

42

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

37/56

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 11

agcatcgagt cggccttggt g

21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 12

gcggctgaag acggcctatg t

21

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

38/56

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 13

tacggaagtg ttacttctgc

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 14

tgtgggaggt tttttctcta

20

<210> 15

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

39/56

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 15

gttttcccag tcacgac

17

<210> 16

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 16

caggaaacag ctatgac

17

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40/56

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 17

ccaatcgcat gtgcttcaac

20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 18

tggctattcc aaatgggagg

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

41/56

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 19

ctcagaagta ccaaggaagg

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 20

atgcgaagg agtgatgtcc

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

42/56

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 21

gcaggtgact gaagctgtag

20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 22

atgcgaaggg agtgatgtcc

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

43/56

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially
synthesized primer sequence

<400> 23

tcttccatct gcagctatgg

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially
synthesized primer sequence

<400> 24

ggaggaggtg aaaagactcg

20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

44/56

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially
synthesized primer sequence

<400> 25

tcttccatct gcagctatgg

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially
synthesized primer sequence

<400> 26

ggaggaggtg aaaagactcg

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

45/56

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 27

atatctgcac tgatgggtcc

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 28

caagtggaat ttgcaactgg

20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

46/56

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially
synthesized primer sequence

<400> 29

atatctgcac tgatgggtcc

20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially
synthesized primer sequence

<400> 30

caagtggaat ttgcaactgg

20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

47/56

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 31

tggctattcc aaatgggagg

20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 32

ctatttaggt gacactatag

20

<210> 33

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

48/56

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 33

gtaatacgac tcactatagg gc

22

<210> 34

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 34

aagcgactat gtgacaatcc agtgc

25

<210> 35

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

49/56

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 35

accaggtct ccagatgtaa catgc

25

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 36

aagcgactat gtgacaatcc

20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

50/56

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 37

tggctttacc ctcactaacg

20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 38

ttagtagaga cacttcacgc

20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

51/56

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 39

gactgtgaca acaccattgg

20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 40

gcattgacat agatgagtgc

20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

52/56

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 41

ccaatgactt ggaatgtacc

20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 42

gcatgttaca tctggagacc

20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

53/56

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially
synthesized primer sequence

<400> 43

cctctccagt tgcaaattcc

20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an artificially
synthesized primer sequence

<400> 44

ccagtgtctc ttctagttgg

20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

54/56

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 45

aaccatcag aggttcttcg

20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 46

tcgtgttctc acatatttgg

20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

55/56

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence.

<400> 47

caaggcatat gggcttaagg

20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 48

gctggttgca tacacacagg

20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

56/56

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 49

ataccaaaat gtcaagaccc

20

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 50

gaaagtcact ttctgatacc

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05068

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C07K 14/47, C07K 16/18, C12P 21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C07K 14/47, C07K 16/18, C12P 21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), DDBJ/GENBANK/EMBL/GENESEQ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LAWLER J., et al., "Cloning and sequencing of chicken thrombospondin", <i>The Journal of Biological Chemistry</i> (1991), Vol.266, No.13, pp.8039-8043	1-10
A	LAWLER J. et al., "Characterization of the murine thrombospondin gene", <i>Genomics</i> (1991), Vol.11, No.3, pp.587-600	1-10
A	LAWLER J. et al., "The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins", <i>The Journal of Cell Biology</i> (1986), Vol.103, No.5, pp.1635-1648	1-10
A	TOLSMA S. S. et al., "Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity", <i>The Journal of Cell Biology</i> (1993), Vol.122, No.2, pp.497-511	1-10
A	VAZQUEZ F. et al., "METH-1 and METH-2 are novel proteins that contain the anti angiogenic domain of thrombospondin 1", <i>FASEB Journal</i> (1997), Vol.11, No.3, pp.A336	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
21 August, 2000 (21.08.00)Date of mailing of the international search report
05 September, 2000 (05.09.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05068

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PA	QABAR A. N. et al., "Expression and characterization of novel thrombospondin 1 type I repeat fusion proteins", <i>Biochemical Journal</i> (February 2000), Vol.346, No.1, pp.147-153	1-10
PA	VAZQUEZ F. et al., "METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity", <i>Journal of Biological Chemistry</i> (August 1999), Vol.274, No.33, pp.23349-23357	1-10
PX	NETO E. D. et al., "Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tag", <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> (March 2000), Vol.97, No.7, pp.3491-3496	8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 15/12, C07K 14/47, C07K 16/18, C12P 21/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 15/12, C07K 14/47, C07K 16/18, C12P 21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), DDBJ/GENBANK/EMBL/GENESEQ

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	LAWLER J., et al. "Cloning and sequencing of chicken thrombospondin", The Journal of Biological Chemistry(1991), Vol. 266, No. 13, p. 8039-8043	1-10
A	LAWLER J., et al. "Characterization of the murine thrombospondin gene", Genomics(1991), Vol. 11, No. 3, p. 587-600	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.08.00

国際調査報告の発送日

05.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

4N

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	LAWLER J., et al. "The structure of human thrombospondin, an adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins", The Journal of Cell Biology(1986), Vol. 103, No. 5, p. 1635-1648	1-10
A	TOLSMA S.S., et al. "Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity", The Journal of Cell Biology(1993), Vol. 122, No. 2, p. 497-511	1-10
A	VAZQUEZ F., et al. "METH-1 and METH-2 are novel proteins that contain the anti angiogenic domain of thrombospondin 1", FASEB Journal(1997), Vol. 11, No. 3, p. A336	1-10
PA	QABAR A.N., et al. "Expression and characterization of novel thrombospondin 1 type I repeat fusion proteins", Biochemical Journal(Feb. 2000), Vol. 346, No. 1, p. 147-153	1-10
PA	VAZQUEZ F., et al. "METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angiogenic inhibitory activity", Journal of Biological Chemistry (Aug. 1999), Vol. 274, No. 33, p. 23349-23357	1-10
PX	NETO E.D., et al. "Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tag", Proc. Natl. Acad. Sci. USA(Mar. 2000), Vol. 97, No. 7, p. 3491-3496	8